

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

DOTTORATO DI RICERCA IN
PRODUZIONE E SANITÀ DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE
INDIRIZZO: SCIENZE DELL'ALLEVAMENTO ANIMALE
XXII CICLO

“Analisi di alcuni fattori inerenti alla fecondazione in vitro nella specie bufalina (*Bubalus bubalis*)”

TUTOR:
CHIAR.MO PROF.
LUIGI ZICARELLI

CANDIDATA
DOTT.SSA
EVELINA MARIOTTI

CORRELATORE:
CHIAR.MA PROF.SSA
BIANCA GASPARRINI

COORDINATORE:
CHIAR.MA PROF. SSA
MARIA LUISA CORTESI

NOVEMBRE 2009

INDICE

1	INTRODUZIONE	3
1.1	Produzione embrionale in vitro (IVEP).....	10
1.2	La fecondazione nei mammiferi	17
1.3	Induzione della capacitazione e della reazione acrosomiale in vitro	23
1.4	La fecondazione in vitro nel bufalo: stato dell'arte	27
2	PARTE SPERIMENTALE	34
2.1	SCOPO DEL LAVORO	45
2.1.1	ESPERIMENTO 1: Valutazione dell'effetto toro sulla risposta alla capacitazione con agenti induttori noti.....	46
2.1.2	ESPERIMENTO 2: Effetto della melatonina sulla capacitazione in vitro. ...	53
2.1.3	ESPERIMENTO 3: Effetto delle BOEC sulla capacitazione e sulla fecondazione in vitro.	61
2.1.4	ESPERIMENTO 4: Valutazione degli effetti dell'osteopontina (OPN) sulla capacitazione e sulla fecondazione in vitro.	83
	Esperimento 4a : Effetto dell'OPN sulla capacitazione in vitro.....	83
	Esperimento 4b: Effetto dell'aggiunta di OPN durante la IVF.	91
2.1.5	ESPERIMENTO 5: Effetto della plasmina sulla reazione acrosomiale nel bufalo.....	104
3	Conclusioni	118
4	Bibliografia	128

1 INTRODUZIONE

L'allevamento del bufalo rappresenta un elemento fondamentale nell'economia delle zone del DOP "mozzarella di bufala campana" e, particolarmente in Campania dove insiste circa l'80% del patrimonio bufalino nazionale, producendo un indotto di rilevante impatto socio-economico. Nell'azienda bufalina l'ottimizzazione dei costi di produzione e la salvaguardia dei parametri utili ad ottenere una materia prima di qualità elevata, incrementa la redditività. L'intenso lavoro di ricerca e di selezione svolto nel corso degli anni nell'allevamento bufalino, ha prodotto come risultato un incremento della produzione di latte che è stata accompagnata dal miglioramento delle caratteristiche qualitative attribuibili principalmente alla razionalizzazione delle tecniche di allevamento (Amante et al., 2001).

Dal 1977 (anno dell'istituzione del libro genealogico) ad oggi la produzione media nazionale è aumentata di circa 600 kg/lattazione e la percentuale di grasso e proteine è passata da 6,4% e 4,3% rispettivamente a 8,3% e 4,7% (Amante et al., 2001). Il miglioramento quanti-qualitativo in definitiva è avvenuto lavorando sia su fattori ambientali, tra i quali spiccano quelli alimentari, sia sulla migliore conoscenza del potenziale produttivo dei singoli soggetti perseguito con l'istituzione dei controlli funzionali e l'introduzione di tecnologie innovative. Si è giunti così all'adozione di sistemi di allevamento più consoni alle esigenze nutrizionali e manageriali della specie.

La principale pecca di questo processo è rappresentato da un più lento miglioramento genetico della specie bufalina rispetto alle altre di interesse zootecnico. Infatti sebbene negli ultimi quarant'anni la specie bufalina sia

cresciuta sul nostro pianeta del 86% vs 34% di quella bovina (Gasparrini, 2002), il minor impiego delle biotecnologie della riproduzione normalmente utilizzate per la bovina ha portato ad un ritardo nel progresso genetico di questa specie. Per accelerare il miglioramento genetico nel prossimo futuro si dovrà necessariamente utilizzare la selezione per via paterna, attraverso l'uso routinario dell'inseminazione strumentale, e per via materna con l'impiego di tecniche che massimizzino la produzione di vitelli da soggetti ad elevata produzione.

Le Biotecnologie della Riproduzione

Le biotecnologie della riproduzione sono senza dubbio uno dei prodotti più emblematici di ricerca applicata nel campo delle scienze della vita e della zootecnia. Queste nuove tecnologie hanno contribuito in maniera decisiva all'evoluzione dell'allevamento negli ultimi 60 anni (Thibier M., 2005), consentendo di porre le basi per una radicale trasformazione della zootecnia e dei sistemi produttivi. Una delle caratteristiche fondamentali che un allevamento moderno deve possedere per poter essere competitivo sul mercato, è sicuramente quella di riuscire ad ottenere in tempi sempre più brevi un notevole miglioramento genetico senza però trascurare quelle che sono le esigenze del consumatore, sempre più sensibile alla qualità del prodotto e al benessere degli animali.

L'importanza fondamentale assunta dal miglioramento genetico, come mezzo per ammortizzare il costante aumento dei costi fissi di produzione, ha indotto molti ricercatori a focalizzare la propria attenzione sulle biotecnologie riproduttive. A questo proposito sicuramente fondamentale risulta l'utilizzo di varie tecnologie quali: l'inseminazione strumentale (IS), la superovulazione

(SO) ed il trasferimento embrionale (ET), il sessaggio embrionale, la produzione embrionale in vitro (IVEP) e la crioconservazione delle cellule germinali (spermatozoi ed oociti) e degli embrioni; tutte queste tecniche, già utilizzate nella specie bovina, risultano però di difficile applicazione e diffusione nella specie bufalina di fondamentale interesse zootecnico in quanto rappresenta una risorsa di grande valore economico nel Mezzogiorno d'Italia. In particolare, l'enorme impatto sull'economia di questa specie è dovuto alla produttività in termini di latte, che si è riusciti a migliorare sempre più nel corso degli anni, grazie ad interventi mirati a selezionare gli animali in base a questa caratteristica. Tutto ciò fa sì che la genetica della Bufala di razza Mediterranea Italiana sia la più richiesta nel mondo.

In generale, il miglioramento genetico nei grandi mammiferi è limitato da svariati fattori, quali il lungo intervallo generazionale e la produzione di un solo redo per anno; inoltre, la ricombinazione genica, che si verifica al momento della fecondazione, rende impossibile prevedere il valore genetico di un individuo, a meno che non si ricorra alla valutazione delle produzioni delle figlie, mediante prove di progenie, nel caso dei maschi, oppure dei dati di lattazione, nel caso delle femmine. Tuttavia negli ultimi anni l'utilizzo dell'IS ha ottimizzato il contributo paterno al miglioramento genetico che, dunque, ha subito un notevole impulso. L'uso di tale tecnica consente di introdurre genotipi desiderati nell'ambito di una popolazione animale in tempi notevolmente ridotti. Questa tecnica, utilizzata in oltre il 70% della popolazione bovina italiana, sarebbe auspicabile anche nell'ambito dei programmi di miglioramento genetico della bufala, specie dalle potenzialità produttive notevoli, nonostante lo scarso impegno profuso nei piani di selezione genetica finora perseguita per via materna. Nella bufala, però, alcuni fattori fisiologici, quali l'ampia variabilità della

durata delle manifestazioni estrali, l'alta incidenza di calori silenti ed il riscontro di doppie manifestazioni estrali, hanno reso gli interventi di IS difficilmente programmabili, anche quando si ricorre alla sincronizzazione dei calori (Zicarelli L., 2002).

Tutto ciò, insieme all'aumento dei costi di produzione, non ha fatto altro che spingere molti ricercatori a cercare di sfruttare le biotecnologie in campo riproduttivo per accelerare il miglioramento genetico della specie bufalina, rendendola così competitiva sul mercato.

Tra le varie tecnologie finora citate quelle che meglio si prestano ad ottenere in tempi brevi un rapido miglioramento genetico esaltandone il contributo materno, sono sicuramente la SO e l' ET o MOET (Multiple Ovulations and Embryo Transfer). Per meglio comprendere l'importanza e la diffusione di queste tecnologie, basta pensare che più di mezzo milione di embrioni bovini sono stati trasferiti nel 2003.

La SO consiste nell'induzione di ovulazioni multiple in animali generalmente monovulanti ed il metodo adottato prevede il trattamento degli animali, previamente sottoposti a somministrazione di progestageni, con dosi frazionate di estratti ipofisari di origine ovina o suina, che promuovono la maturazione e la deiscenza di un numero di follicoli superiore a quello fisiologico. La tappa successiva è rappresentata dal recupero degli embrioni, ottenuti mediante lavaggio delle corna uterine al giorno 6-7 delle femmine donatrici, inseminate in prossimità dell'ovulazione, ed il loro trasferimento in animali riceventi precedentemente sincronizzati. Per ottimizzare i risultati di tale tecnica è necessario utilizzare solo soggetti in perfette condizioni sanitarie del tratto genitale, con pervietà delle tube, con cicli regolari e non gravidi. Diverse

esperienze hanno dimostrato, però, che esistono forti limitazioni all'utilizzo dei programmi di MOET nella bufala, specie in cui il recupero medio di embrioni è molto inferiore a quello che si osserva nella specie bovina: meno di 2 embrioni nella bufala (Zicarelli L., 2001) e tra 7 e 10 nella bovina a seconda della razza e del trattamento di SO impiegato (Halser J.F. et al., 2003; Baruselli P.S. et al., 2006). Da questi valori si può, quindi, chiaramente evidenziare quanto sia bassa nella bufala la risposta alla SO (Misra A.K., 1997; Zicarelli L., 1997); infatti, mentre nella bovina l'88% degli animali risponde ai trattamenti, nella bufala questo valore scende al 55%. Il minore recupero è dovuto alle caratteristiche fisiologiche intrinseche di questa specie quali ad esempio l'esigua popolazione di follicoli primordiali presenti nell'ovaio alla nascita, 20.000 vs 100.000 della vacca (Samad H.A. and Nasser A.A., 1979; Danell B., 1987; Le Van T.Y. et al., 1989) e alla scadente qualità degli oociti, nella bufala; infatti, rispetto alla vacca, si osserva una più bassa incidenza di oociti di buona qualità (Boni R. et al., 1996) ed una minore adesione delle cellule della granulosa. Ci sono, inoltre, molti casi in cui al momento del flushing si osservano vari corpi lutei (CL), ma il numero di embrioni recuperato risulta inferiore al numero di CL.

L'impossibilità di ottenere buoni risultati, o quantomeno paragonabili a quelli avuti in altre specie, ha evidenziato negli ultimi anni una notevole crescita d'interesse verso l'IVEP, ai fini di accelerare la diffusione di genotipi superiori. Un fattore che ha sicuramente contribuito a considerare quest'ultima come una valida alternativa alla produzione embrionale in vivo è l'avvento della metodica dell'Ovum Pick Up (OPU). Questo procedimento consiste nel prelievo in vivo, per via transvaginale ecoguidata, di oociti immaturi da animali donatori noti, consentendo, grazie alla sua ripetibilità, il recupero di una notevole quantità di

oociti che vengono poi introdotti nel sistema di IVEP. Quest'ultimo prevede una fase di maturazione degli oociti, una di fecondazione e la successiva messa in coltura dei presunti zigoti fino allo stadio di blastocisti, stadio in cui gli embrioni possono essere trasferiti o sottoposti a sessaggio e/o congelamento. Questa tecnica, applicata per la prima volta in campo umano (Lenz S. et al., 1987) è stata utilizzata nel bufalo da Boni et al. (1993) e da Galli et al. (1998); questi ultimi hanno, così, ottenuto i primi 3 vitelli bufalini nati dal trasferimento di embrioni prodotti da oociti recuperati con l'OPU, maturati e fecondati in vitro e trasferiti in ovidutto di pecora dopo due giorni dalla fecondazione.

I vantaggi nell'utilizzo della tecnica OPU sono dovuti alle sue maggiori possibilità di impiego, ovvero nei casi in cui la tecnica della SO non è applicabile, come ad esempio nei soggetti in non perfette condizioni sanitarie del tratto genitale, gravidi fino al 4° mese, aciclici e prepuberi; in più è una tecnica che non interferisce con lo stato fisiologico della donatrice, in quanto non necessita di una stimolazione ormonale, è facilmente eseguibile, ripetibile, non incide negativamente sulla sfera riproduttiva dell'animale e consente di visualizzare e, quindi, pungere, tutti i follicoli ecograficamente visibili, a partire dal diametro di 2 mm (Janssen-Caspars H.A.B. et al., 1988). Un altro vantaggio è rappresentato dal fatto che ad ogni aspirazione dei follicoli, si ottiene un azzeramento del ciclo, che consente lo sviluppo di una nuova ondata, evitando così il fenomeno della dominanza di un follicolo sugli altri che comporterebbe l'atresia dei follicoli subordinati. Le ondate follicolari, perciò, passano da 2-3 per ciclo estrale a 6 nello stesso periodo di tempo, esitando nella produzione di un maggiore numero di oociti utilizzabili ai fini della IVEP. Questo fa sì che l'OPU possa essere ripetuto bisettimanalmente ottenendo il massimo recupero di oociti e migliorandone, tra l'altro, anche la qualità. I dati più recenti in termini di

percentuali di embrioni prodotti in vitro da oociti prelevati mediante OPU, ripetuto ogni 3-4 giorni, hanno mostrato un notevole miglioramento (Neglia et al., 2003) rispetto ai dati precedenti (Boni et al., 1993). E' stato dimostrato che l'efficienza IVEP migliora quando vengono utilizzati oociti prelevati mediante OPU rispetto a quelli ottenuti da ovaia da macello (29.7 vs 19.9 % di blastocisti rispettivamente; Neglia et al., 2003). Questa tecnica risulta competitiva rispetto alla MOET particolarmente nella specie bufalina. Infatti, se da un lato per ogni OPU effettuato si producono in media nella bovina 0.8 e nella bufala 0.2 embrioni da donatrici adulte rispetto ai 4.4 ed 1.7 ottenibili nell'ambito di un programma di SO-ET (Zicarelli, 2001), dall'altro, quest'ultimo non può essere ripetuto prima che siano trascorsi almeno 75 giorni per la bovina e 100 per la bufala. Ovviamente, non va dimenticato che sebbene l'efficienza di recupero nella bufala sia simile a quella che si riscontra nella bovina, il numero di oociti recuperati risulta nettamente inferiore per la diversa entità della popolazione follicolare che contraddistingue le due specie. Conseguentemente, con l'OPU la produzione media di embrioni prodotti ad esempio nell'arco di sei mesi aumenta significativamente (41 vs 15 nella bovina e 11 vs 5 nella bufala, rispettivamente con le tecniche OPU e SO). Inoltre, se si considera che la bufala è una specie stagionale, è estremamente improbabile che l'animale possa rimanere ciclico per 6 mesi consecutivi e che quindi si possa raggiungere il numero di 5 embrioni prodotti con la SO, dato che diventa così puramente teorico, avvalorando ancora di più i risultati ottenuti con l'utilizzo della tecnica dell'Ovum Pick Up. In più, va sottolineato che esiste un'elevata variabilità individuale nel reclutamento follicolare e che la ripetibilità di tale parametro consente di poter effettuare una selezione delle migliori donatrici sulla base dei primi 4 prelievi OPU (Gasparrini B. et al., 2002), rendendo la tecnica maggiormente

competitiva in termini di resa embrionale; la tecnica OPU, quindi, apre nuove prospettive consentendo di incrementare ulteriormente l'efficienza riproduttiva della specie. Inoltre, la possibilità di utilizzare tale tecnica su animali di elevato valore produttivo, si traduce in una notevole riduzione dell'intervallo generazionale e, conseguentemente, in un'ulteriore accelerazione del progresso genetico.

1.1 Produzione embrionale in vitro (IVEP)

Il primo successo delle tecnologie di Fecondazione Assistita si ebbe in campo umano nel 1978 con la nascita di Louise Brown (Steptoe et al., 1978). Nell'ambito delle produzioni animali non abbiamo dovuto attendere molto per avere successi di pari importanza. Nel 1981, infatti, si ha la nascita di Virgil, il primo vitello nato da fecondazione in vitro (Brakett et al., 1982), e nel 1998 Galli et al. ottengono i primi 3 vitelli bufalini nati dal trasferimento di embrioni ottenuti da oociti recuperati mediante OPU, maturati e fecondati in vitro ma poi coltivati in vivo, in tube legate di pecora.

Se è vero che dalla tecnica OPU si riescono ad ottenere oociti da una donatrice viva e nota, il recupero dei gameti femminili nella routine di laboratorio, avviene più comunemente da ovaie di animali da macello per ridurre tempi e costi delle sperimentazioni. Il recupero degli oociti immaturi dalle ovaie è operato con diversi metodi, tra i quali la dissezione follicolare, che permette un recupero consistente e permette di scartare i follicoli atresici, lo slicing o "tagliuzzamento" da cui si ricava un numero maggiore di oociti, ma una popolazione più eterogenea e l'aspirazione follicolare, che prevede l'utilizzo di un ago collegato ad una pompa a vuoto che funziona a pressione negativa controllata e permette di reclutare le uova presenti nei follicoli più superficiali.

Nel caso però dei primi due metodi è richiesto più tempo rispetto all'aspirazione, essendo delle procedure meno pratiche, soprattutto quando si dispone di un elevato numero di ovaie; in questo caso, la vitalità degli oociti può essere compromessa. Con questa ultima metodica, nella vacca si recuperano, mediamente da ciascun ovaio, 10 oociti di buona qualità mentre nella bufala il recupero medio è di 2.4 (Gasparrini, 2002). Il metodo e le condizioni di recupero (terreni impiegati, temperatura, etc.), le dimensioni dei follicoli aspirati, l'età degli animali (Yang et al., 1998), sono tutti fattori d'importanza fondamentale perché in grado di condizionare le varie fasi della coltura in vitro successiva. Dopo il recupero dalle ovaie, solo gli oociti appartenenti al grado A e B, ossia quelli che allo screening morfologico al microscopio presentano citoplasma omogeneo e risultano ricoperti per la maggior parte della superficie da diversi strati di cellule del cumulo (Neglia et al., 2003), sono utilizzati ai fini dell'IVEP.

L'IVEP consta di una fase di maturazione nucleare e citoplasmatica degli oociti (IVM), seguita da una di fecondazione (IVF) e messa in coltura (IVC) dei presunti zigoti fino allo stadio di blastocisti. A questo stadio gli embrioni possono subire destini differenti quali il trasferimento (ET), il sessaggio e/o il congelamento.

Dunque, la prima fase dell'IVEP a cui gli oociti vanno incontro dopo essere stati recuperati e selezionati è l'IVM.

In vivo, la crescita della cellula uovo, all'interno del follicolo, è fortemente condizionata dalla presenza di ormoni quali l'FSH (ormone follicolo stimolante), l'LH (ormone luteinizzante) e l'estradiolo 17- β . L'oocita va incontro ad una serie di modulazioni di organelli e di inclusi cellulari, così come di trascrizioni

genomiche, che sono indispensabili per il raggiungimento della sua competenza allo sviluppo.

Durante l'IVM, gli oociti devono disporre di un terreno di coltura che gli permetta di raggiungere la maturazione nucleare e citoplasmatica, considerando che, si aspirano, di norma, follicoli con un diametro compreso tra i 2 e gli 8 mm, quindi con oociti immaturi. La durata della maturazione nel bovino varia tra le 20 e le 24 ore e nel bufalo tra le 20 e le 22 ore, al termine delle quali si ha l'estrusione del primo corpo polare e le uova sono pronte per essere fecondate.

Alla messa in maturazione degli oociti fa seguito l'IVF, uno dei principali fattori cruciali dell'intero sistema, perché nonostante la percentuale di maturazione nucleare degli oociti bufalini sia simile a quella osservata per gli oociti bovini (87% vs 94%), il cleavage (divisione a due cellule) risulta significativamente più basso (65% vs 84%; Neglia et al., 2003).

Si può utilizzare sia seme fresco che congelato, ed in quest'ultimo caso, è necessario isolare per la fecondazione solo gli spermatozoi vivi e mobili dopo scongelamento (Galli et al., 1996). Pare che la membrana plasmatica degli spermatozoi di bufalo sia particolarmente fragile soprattutto nella regione acrosomiale. Pertanto, ricorrendo al seme congelato è necessario scegliere quello che abbia spermatozoi dotati di elevata motilità. A tale scopo ci si affida a tecniche come lo "Swim-up" (Chuangsoongneon et al., 1991; Madan et al., 1994; Chauhan et al., 1997; Nandi et al., 2002; Boni et al., 1994; Bacci et al., 1991; Boni, 1994; Neglia et al., 2001), e la separazione per diversi gradienti di densità mediante Percoll (Boni et al., 1999; Totey et al., 1993a; Totey et al., 1993b; Gasparini et al., 2000). Inoltre, al fine di migliorare la motilità e la capacità fecondante del seme utilizzato nell'IVF, molti ricercatori riportano

l'aggiunta di diverse sostanze a questi terreni, ad esempio la caffeina come riportato da vari autori (Totey et al., 1992, Madan et al., 1994, Chauhan et al., 1997, Bacci et al., 1991), la teofillina (Jainudeen et al., 1993) ed il complesso penicillamina-ipotaurina-epinefrina (Madan et al., 1994; Totey et al., 1993; Totey et al., 1996).

Ulteriori studi sono stati condotti su terreni base, quali il Tyrode's modified medium (TALP; Totey et al., 1992; Madan et al, 1994a; Totey et al., 1996; Gasparrini et al, 2000; Boni et al, 1994) o il Brackett e Oliphant (BO; Totey et al., 1992; Madan et al, 1994b; Chauhan et al, 1997a; Chauhan et al, 1997b; Chauhan et al, 1997c; Nandi et al, 1998; Bacci et al, 1991) per dimostrare la loro compatibilità all'IVF nel bufalo.

E' stato anche osservato un effetto positivo delle cellule del cumulo, al momento dell'IVF nella bufala (Gasparrini et al., 2007a) e nel bovino (Zhang et al., 1995), come dimostra la riduzione del cleavage e della produzione di blastocisti in assenza delle stesse.

L'ultimo step dell'IVEP è l'IVC degli zigoti fino allo stadio di blastocisti. Nonostante sia provato che gli embrioni bufalini vengano coltivati con successo nelle tube di coniglio (Chantareprateep et al., 1989) e di pecora (Galli et al 1998), l'uso di un ospite intermedio appare poco pratico in vista di una produzione su larga scala. La via più pratica ed economica è quella di continuare la coltura degli zigoti in vitro. Così, alla luce dei benefici apportati dalla coltura in vivo, nel 1987 Gandolfi e Moor misero in pratica dei sistemi di co-coltura, e monostrati di cellule oviduttali vennero impiegati con successo nell'IVC di zigoti ovini e suini.

Successivamente furono impiegate a tal fine anche cellule di fegato di ratto bufalino (BRL; Hasler et al., 1995) e cellule renali di scimmia (VERO; Carnegie et al., 1997). Le applicazioni del sistema di co-coltura con cellule oviduttali ad embrioni bufalini hanno dato basse percentuali di blastocisti (8.2%), almeno fino a quando non si sono usati monostrati di cellule del cumulo in presenza di cellule oviduttali (Madan et al., 1994). Tuttavia, questo sistema presenta diversi svantaggi perché richiede la gestione di cellule soggette a variazioni biologiche ed implica l'uso di terreni complessi, come il TCM addizionato di siero, che non permette di avere un sistema di coltura definito che faciliti lo studio della fisiologia embrionale. Inoltre, l'impiego di siero pare determini anomalie embrionali note sotto l'acronimo LOS (Large-Offspring Syndrome) o Sindrome della macrosomia fetale. Un evento senza precedenti per importanza è la sintesi del "Synthetic oviductal fluid" (SOF) (Keskintepe et al., 1995; Tervit et al., 1972), il primo medium di coltura semi-definito, nato dallo studio delle caratteristiche biochimiche del fluido oviduttale ovino ed in seguito addizionato di amminoacidi. Nel 1999 Boni et al. hanno messo a confronto due sistemi di coltura differenti di embrioni bufalini: TCM 199 addizionato di siero fetale bovino al 10% in co-coltura con cellule BRL ed il SOF con 0.5% di amminoacidi essenziali, 1% di amminoacidi non essenziali e 8 mg/ml di albumina sierica bovina (BSA).

Nel caso del SOF la tensione di ossigeno dell'ambiente di incubazione è stata ridotta al 7%. Da questa prova è emerso che l'impiego del SOF non solo consente di ottenere una migliore percentuale di blastocisti rispetto all'uso di cellule come substrato colturale (13.7%vs 7%), ma anche embrioni morfologicamente migliori con un nodo più compatto e in grado di svilupparsi più velocemente. Ricordiamo infatti che Totey et al (1996) hanno dimostrato

una correlazione diretta tra la precocità di sviluppo dell'embrione e il numero di cellule finali.

L'acquisizione di maggiori informazioni specie-specifiche riguardanti la fisiologia embrionale, ottenute nell'arco di anni di sperimentazione, si è tradotta in un miglioramento significativo dell'efficienza di produzione embrionale in vitro nella specie bufalina, attestata da rese in blastocisti, ovvero di embrioni trasferibili, fino al 30% (Gasparrini, 2006) e dall'ottenimento di gravidanze a termine dopo trasferimento di embrioni prodotti in vitro congelati (Galli et al, 1998; Neglia et al., 2004; Madan et al., 1996; Hufana-Duran D et al., 2004; Sá Filho MF et al., 2005; Huang Y et al., 2005). Ciononostante l'ottimizzazione dell'efficienza IVEP in questa specie si rende necessaria perché tale tecnica possa lasciare il campo della sperimentazione ed entrare nel mondo operativo.

Crioconservazione

Ben poche informazioni sono disponibili per quanto attiene alla crioconservazione di embrioni nella specie bufalina, benché la debolezza alla crioconservazione sia tra i principali fattori che limitano la diffusione in campo della tecnologia OPU-IVEP in questa specie.

Verosimilmente, si può ritenere che l'elevato contenuto lipidico conferisca una scarsa resistenza al congelamento degli embrioni bufalini prodotti in vitro (Boni et al., 1992)

La coltura in vivo, nelle tube di pecora, di zigoti già maturati e fecondati in vitro, conferisce agli embrioni maggior resistenza al congelamento, tanto che, nel 1998, Galli et al hanno riportato la nascita di tre vitelli dal trasferimento di 9 embrioni crioconservati, ottenuti da oociti prelevati mediante OPU poi fertilizzati

in vitro e trasferiti in ovidutto di pecora due giorni dopo la fecondazione, prima di sottoposti a congelamento lento per la crioconservazione.

Utilizzare ospiti intermedi, tuttavia, appare spesso poco pratico, in particolar modo quando ci si orienti a produzioni embrionali su larga scala.

Ricorrendo a una tecnica già utilizzata nella specie ovina (Naitana et al., 1996), embrioni bufalini interamente prodotti in vitro sono stati vitrificati ottenendo risultati soddisfacenti, con una percentuale di sopravvivenza, intesa come ripristino di una normale morfologia, riespansione della blastocela e sviluppo in vitro, del 65 % (Gasparini et al., 2001). I vari stadi di sviluppo considerati non hanno influito sulla resistenza alla crioconservazione, mentre si è avuta evidenza che embrioni con sviluppo precoce resistono meglio alla vitrificazione rispetto a quelli più tardivi.

Più di recente si sono ottenute gravidanze a termine trasferendo embrioni bufalini interamente prodotti in vitro e quindi vitrificati con la stessa tecnica. (Neglia et al., 2003b). In uno studio successivo sono stati messi a confronto tre strumenti di vitrificazione, la tradizionale paillette da inseminazione, la OPS ed il Cryotop, che differiscono principalmente per i volumi di soluzione vitrificante utilizzati, da cui è emerso che il migliore approccio da utilizzare per la crioconservazione degli embrioni IVP di bufalo sembrerebbe essere il cryotop (De Rosa, 2008).

Gli stessi autori hanno successivamente trasferito embrioni bufalini, interamente prodotti in vitro, e vitrificati con tale metodica ottenendo gravidanze a termine (dati non pubblicati).

1.2 La fecondazione nei mammiferi

Poiché gli studi da noi condotti ineriscono l'ottimizzazione della fecondazione in vitro nel bufalo si ritiene importante trattare l'argomento della fecondazione in maniera più approfondita.

Il processo di fecondazione consiste nella fusione di due cellule, il gamete maschile e quello femminile, per formare una singola cellula: lo zigote. Il sito in cui avviene la fecondazione in tutti gli animali domestici e nella maggior parte degli altri mammiferi è costituito dalla giunzione istmo-ampollare dell'ovidotto.

Gli spermatozoi e le uova dei mammiferi vengono sottoposti a varie modificazioni fisiologiche ed a processi di maturazione prima di poter dar luogo alla fecondazione. Nella maggior parte dei mammiferi la fecondazione inizia dopo che è stato espulso il primo globulo polare, in modo che lo spermatozoo penetra nell'uovo mentre è in atto la seconda divisione meiotica.

Il materiale seminale maschile (sperma o liquido spermatico) è costituito essenzialmente da cellule germinali maschili mature (spermatozoi) e da un liquido semigelatinoso biancastro prodotto dalle ghiandole annesse alle vie genitali (plasma seminale) nel quale gli spermatozoi stanno sospesi.

Uno spermatozoo è costituito dalla testa, contenente il nucleo con il corredo cromosomico paterno, e dalla coda, lungo flagello mobile che garantisce la mobilità dello spermatozoo nelle vie genitali femminili.

La fecondazione comprende diverse fasi:

- la capacitazione
- il riconoscimento e legame del gamete maschile alla zona pellucida (ZP)
- la reazione acrosomiale

- la penetrazione della ZP
- la fusione dei gameti

Gli spermatozoi eiaculati non hanno ancora la capacità fecondante che acquisiranno a livello del tratto genitale femminile mediante il processo di capacitazione.

Il processo di capacitazione, che comporta una serie complessa di modificazioni biochimiche e funzionali, si svolge durante la permanenza nelle vie genitali femminili ed è un fenomeno dipendente da temperatura, pH e Ca^{++} .

Il processo di capacitazione comporta la rimozione delle proteine seminali ed epididimali dalla superficie dello spermatozoo, alterazioni di molecole di superficie (glicoproteine) della membrana plasmatica dello spermatozoo, variazione dell'attività metabolica, aumento della motilità. Esistono vari enzimi e fattori del tratto femminile che sono implicati nel processo di capacitazione (arilsolfatasi, fucosidasi, taurina).

Gli eventi molecolari che innescano il processo di capacitazione sono:

- efflusso di colesterolo
- modificazioni del flusso ionico
- alterazione del potenziale di membrana
- fosforilazione di proteine (a livello dei residui tirosinici) che inducono l'iperattivazione e la reazione acrosomiale (AR)

Il processo di capacitazione inizia con un efflusso di colesterolo dalla membrana plasmatica dello spermatozoo con conseguente diminuzione del rapporto colesterolo/fosfolipidi, seguito da un incremento dei processi di metilazione e da un aumento della sintesi di fosfatidilcolina a partire da fosfatidil-etanolamina.

Ciò comporta una iperpolarizzazione di membrana ed un aumento della sua fluidità, con un aumento del flusso ionico di calcio e bicarbonato. L'entrata di calcio induce la formazione di una riserva endogena a livello dell'acrosoma, dei mitocondri e forse del nucleo. Inoltre l'iperpolarizzazione della membrana e l'aumento del flusso di ioni Ca^{++} e HCO_3^- attivano l'adenilato-ciclastasi per la formazione di AMPc dall'ATP. L'AMPc attiva una proteina chinasi A (PKA) che induce la fosforilazione di proteine tirosiniche. La fosforilazione delle proteine tirosiniche è data anche dal legame dell'Epidermal Growth Factor (EGF) al suo recettore (EGFR). Le proteine tirosiniche che vengono fosforilate sono:

le SNARE, proteine della testa dello spermatozoo altamente conservate, che inducono la polimerizzazione dei filamenti di actina che si dispongono in posizione sub-acrosomiale in modo da captare la fosfatidilcolina (PCL), attivata durante la reazione acrosomiale;

le AKAP (A Kinase Anchoring Protein), proteine strutturali di ancoraggio della coda dello spermatozoo. Le AKAP attivate inducono un cambiamento della struttura e della funzionalità del flagello in modo da iperattivarlo. La iperattivazione è caratterizzata dall'aumento della motilità dello spermatozoo (tale aumento della motilità è molto evidente in alcune specie come ad es. l'uomo).

Nei media per la capacitazione *in vitro* vengono, generalmente, aggiunti:

- substrati energetici (glucosio, lattato, piruvato)
- un accettore di colesterolo (albumina sierica, HLP, β ciclodestrine)
- sali: NaHCO_3^- , Ca^{2+} , Na^+ , K^+

La fase successiva alla capacitazione spermatica è l'interazione dei gameti, un evento specie-specifico che inizia con il riconoscimento e, quindi, il legame di

molecole presenti sulla membrana plasmatica dello spermatozoo (recettori) e sulla superficie della zona pellucida (ligandi).

L'interazione dello spermatozoo capacitato con la zona pellucida innesca un processo di trasduzione di segnali mediati dal Ca^{++} che esita nella reazione acrosomiale. Infatti vengono rilasciati degli enzimi acrosomiali, quali esterasi, acrosina e neuroaminidasi, necessari perché lo spermatozoo oltrepassi la zona pellucida e, quindi, lo spazio perivitellino per raggiungere la membrana plasmatica dell'oocita.

L'induzione della reazione acrosomiale è legata a:

- agonista naturale ZP3 (primo sito di riconoscimento dei gameti)
- progesterone
- fluido follicolare (FF)
- secrezioni delle cellule del cumulo (prostaglandine, steroli, Gags, glicoproteine)
- modificazioni della permeabilità di membrana
- modificazioni dei livelli intracellulari di Ca^{++}
- alcalinizzazione del citoplasma

In vitro la reazione acrosomiale può essere indotta da :

- Calcio
- Tapsigargina
- Lisofosfatidilcolina (LPC)

Lo spermatozoo entra in contatto con la zona pellucida dell'oocita, sulla quale si trovano le glicoproteine ZP, che sono in grado di interagire con recettori specifici presenti sulla testa dello spermatozoo.

L'entrata dello spermatozoo porta all'attivazione dell'oocita, caratterizzata da modificazioni nucleari, di membrana e citoplasmatiche.

Anche in questo caso si susseguono una serie di eventi:

- una prima ondata di depolarizzazione di membrana;
- un periodo di latenza;
- una seconda ondata di depolarizzazione;
- la reazione corticale (o di zona nei mammiferi), che induce l'esocitosi dei granuli corticali

La reazione corticale è caratterizzata dall'esocitosi dei granuli corticali presenti sotto la membrana plasmatica dell'oocita. Essi contengono enzimi e mucopolisaccaridi che vengono rilasciati nello spazio perivitellino.

L'ipotesi principale è che la reazione corticale serva a prevenire la polispermia e che serva ad alterare chimicamente la ZP in modo da fornire un ambiente batteriologicamente protetto per l'embrione.

Inoltre la membrana plasmatica dell'oocita ingloba i granuli corticali portando alla formazione di una membrana plasmatica a mosaico che induce il "blocco vitellino", caratterizzato dalla polarizzazione della ZP non più attaccabile da altri spermatozoi e determina l'incremento dell'area di superficie con un aumento del turnover metabolico dell'oocita attivato.

L'incremento del Ca^{++} intracellulare indotto dallo spermatozoo penetrato, che si manifesta sotto forma di una lunga serie di oscillazioni, innesca la ripresa della meiosi. Tale incremento attiva la proteina chinasi II calmodulina-dipendente (CAMK II) che inattiva il fattore citostatico (CSF), che a sua volta determina una rapida caduta dei livelli di MPF (M-phase promoting factor). Si ha così l'uscita dall'arresto in MII ed il completamento della divisione meiotica.

Quindi lo spermatozoo innesca il rilascio di Ca^{++} intracellulare necessario ad attivare l'oocita. Due sono le ipotesi possibili che spiegano come faccia lo

spermatozoo ad innescare il rilascio di Ca^{++} intracellulare (Whitaker and Swann, 1993).

L'ipotesi della proteina G è stata formulata in seguito a studi su legami recettore-ormone secondo cui lo spermatozoo si lega ad un recettore di membrana. Tale interazione attiva la proteina G che a sua volta attiva, in seguito a una cascata di segnali, la fosfatidilcolina (PLC) che idrolizza il PIP_2 fosfatidilinositolodifosfato (PIP_2) formando diacilglicerolo (DAG) inositolotrifosfato (IP_3). L' IP_3 si lega ai recettori specifici sul reticolo endoplasmatico causando liberazione di calcio all'interno del citoplasma.

L'ipotesi del Fattore solubile è stata formulata in seguito a studi con microiniezione di estratti solubili spermatici o con l'applicazione della tecnica ICSI. Si ipotizza che un fattore solubile (es. oscellina) rilasciato dallo spermatozoo al momento della fusione, è in grado di attivare la via dell' IP_3 e sarebbe responsabile delle oscillazioni del Ca^{++} intracellulare.

A conferma di tale ipotesi si è visto che, negli oociti di mammiferi, l'iniezione di estratti di sperma determina rilasci ripetuti di calcio (Swann, 1990, 1994; Homa and Swann, 1994; Wu et al., 1997), esocitosi dei granuli corticali e sviluppo fino allo stadio di blastocisti (Stice and Robl, 1990).

E' verosimile che entrambi meccanismi ipotizzati siano validi e concorrano nel determinare l'attivazione della cellula uovo.

Ripresa la meiosi, il secondo globulo polare viene espulso dalla cellula uovo dopo la penetrazione dello spermatozoo e a questo punto inizia la formazione del pronucleo femminile. I due pronuclei aumentano di dimensione ed il pronucleo maschile presenta una decondensazione della cromatina anticipata rispetto al pronucleo femminile.

Quindi i due pronuclei diventano indistinguibili e la loro unione porta alla formazione dello zigote: singamia

1.3 Induzione della capacitazione e della reazione acrosomiale in vitro

La capacitazione, e la conseguente realizzazione della reazione acrosomiale (AR) sono prerequisiti assoluti per il successo della fecondazione in vitro. Solo gli spermatozoi capacitati e con acrosoma intatto sono in grado di legarsi alla zona pellucida.

Un passaggio, quindi, particolarmente critico dell'IVF è quello della capacitazione del seme. In vivo, gli spermatozoi durante il periodo in cui transitano nelle vie genitali femminili per raggiungere il tratto ampollare della tuba uterina sottostanno a particolari modificazioni che li rendono atti alla fecondazione. Tale processo non si accompagna a modificazioni morfologiche apprezzabili a carico dello spermatozoo, ma piuttosto a cambiamenti di natura molecolare che avvengono a livello della membrana plasmatica. L'istmo oviduttale è considerato il sito primario per la capacitazione spermatica (Harper, 1973; Hunter and Hall, 1973; Hunter and Nichol, 1998)

Per far sì che il seme acquisisca dunque la capacità fecondante, tale processo deve essere indotto anche in vitro.

L'eparina è comunemente utilizzata per capacitare gli spermatozoi di bovino (Parrish et al., 1988), uomo (Delgado et al., 1988) e becco (Pereira et al., 2000).

È possibile indurre la capacitazione in vitro incubando gli spermatozoi nel fluido oviduttale (McNutt et al, 1991; Parrish et al, 1989) oppure per alcune specie, in

un medium contenente albumina serica bovina (Go et al, 1985), calcio (Handrow et al, 1989) e bicarbonato (Boatman et al, 1991).

In particolare, i componenti del fluido oviduttale (ODF) presenti al momento dell'estro sembrano influenzare il processo di capacitazione.

L'ODF contiene siero trasudato e sostanze secrete dall'epitelio oviduttale. E' stato osservato che cellule oviduttali di coniglio in coltura sintetizzano una maggiore quantità di proteine se trattate con estrogeni (Oliphan et al, 1984), e che colture di tessuto oviduttale di babbuino sintetizzano differenti proteine durante i differenti stadi del ciclo estrale (Verhage and Fazeleabas, 1998). Nel babbuino, inoltre, si è osservato che la secrezione ampollare di tre glicoproteine è aumentata dagli estrogeni. Sono state evidenziate proteine ovidutto-specifiche secrete durante l'estro nel coniglio (Urzua et al, 1970), nella scimmia (Mastroianni et al, 1970), nella pecora (Sutton et al, 1984; Murray, 1993), nel topo (Kapur and Johnson, 1985), nel ratto (Wang and Brooks, 1986), nel criceto (Leveille et al, 1987; Robitaille et al, 1988), nel maiale (Brown and Chen, 1986), nel babbuino (Verhage and Fazeleabas, 1998) e nel bovino (Malayer et al, 1988, Gerena and Killian, 1990). Si è visto che nella pecora (Voglmayr and Sawyer, 1986) e nel bovino (McNutt et al, 1992) alcune proteine dell'ovidutto si legano agli spermatozoi. Nel bovino, una glicoproteina ovidutto specifica (EAP), secreta dall'epitelio oviduttale (Boice et al, 1990; Wegner and Killian, 1992) al momento dell'estro, si è visto essere in grado di incrementare notevolmente la percentuale di spermatozoi capacitati e promuoverne la capacità fecondante (King et al, 1994).

Diversi fluidi biologici esplicano un'azione capacitante sugli spermatozoi in vitro. Nel bovino è stato dimostrato che il fluido follicolare contiene fattori come

l'albumina serica bovina (Lui et al., 1977) e i glicosaminoglicani (Meizel and Turner, 1986) che giocano un ruolo importante nel processo di capacitazione. Nel criceto, è riportata la capacità del fluido follicolare (FF) di indurre la capacitazione negli spermatozoi (Gwatkin and Anedersen, 1969; Yanagimachi, 1996).

Nella specie ovina, durante l'IVF viene utilizzato il siero di pecora in estro come fattore di capacitazione (Grazyna Ptak et al, 1999).

Sebbene molti agenti abbiano dimostrato di indurre la capacitazione degli spermatozoi in vitro, l'utilizzo dell'eparina in presenza di Ca^{++} extracellulare è ancora il metodo più efficace per la maggior parte delle specie domestiche. Il seme può essere preincubato con eparina (Madan et al., 1994b; Madan et al., 1994a; Chauhan et al., 1997b; Chauhan et al., 1997c; Chauhan et al., 1997a; Boni et al. 1994b; Boni 1994; Bacci et al., 1991; Boni et al., 1999) oppure l'eparina può essere direttamente aggiunta al terreno di fecondazione (Totey et al., 1992; Totey et al., 1993a; Totey et al., 1996; Gasparrini et al., 2000; Neglia et al., 2001).

Alte concentrazioni di eparina possono essere utilizzate per indurre la reazione acrosomiale negli spermatozoi di bufalo anche utilizzando tempi di incubazione brevi (Mehmood et al, 2007), e in questo studio si è dimostrata, inoltre, una correlazione fra il più alto tasso di spermatozoi capacitati e il miglioramento della capacità di fecondazione in vitro.

Gli spermatozoi devono andare incontro alla AR prima di penetrare la zona pellucida e di fondersi con la membrana plasmatica dell'oocita. E' riportato in diversi studi che la AR può essere indotta sia tramite induttori naturali, quali ad esempio la zona pellucida stessa (Florman, 1994) ed il progesterone

(Oehninger et al., 1994), o tramite induttori artificiali, i.e. l'eparina (Parrish et al., 1988) e il calcio ionoforo (Christensen et al., 1996). Il calcio ionoforo A23187, infatti, è ampiamente usato per indurre la AR in diverse specie di mammifero, come il topo (Dodds & Seidel, 1984; Tanphaichitr & Hansen, 1994), il cavallo (Christensen et al., 1996), il gatto (Long et al., 1996), il maiale (Gadella et al., 1995) e il bovino (Fraser et al., 1995).

Ci sono poche pubblicazioni, invece che riportano l'induzione della AR nel bufalo. Chauhan et al. (1997) hanno indotto la AR negli spermatozoi di bufalo utilizzando l'eparina, mentre Sidhu et al. (1984) hanno utilizzato il Ca^{2+} ionoforo A23187 per indurre la AR.

La lisofosfatidilcolina (LPC) è un lipide fusogenico che destabilizza la membrana plasmatica degli spermatozoi e promuove la sua fusione con la membrana acrosomiale esterna, dando così luogo alla reazione acrosomiale (AR). E' una sostanza ampiamente utilizzata per indurre la AR negli spermatozoi capacitati di molte specie di mammiferi, tra cui il bufalo (Roy S.C. and Atreja S.K., 2006).

Ci sono diverse tecniche per evidenziare l'avvenuta AR in spermatozoi di diverse specie. La doppia colorazione con Trypan blue e Giemsa è stata impiegata a tale scopo nel bovino, nel maiale, nell'ariete, nel cavallo (Didion et al., 1989), e nel bufalo (Boccia L., 2006) mentre la colorazione con nigrosina-eosina è stata usata nel bovino (Ooba et al., 1990) e nell'uomo (Talbot & Chacon, 1981). L'immunofluorescenza indiretta con anticorpi monoclonali è stata impiegata per testare spermatozoi di topo (Florman et al., 1984), uomo (Wolf et al., 1985), cavallo (Zhang et al., 1990) e bovino (Rajamahendran et al., 1994). La colorazione con Clorotetraciclina (CTC) è stata applicata a spermatozoi di

topo (Ward & Storey, 1984), uomo (Lee et al., 1987) e ariete (Pe´rez et al., 1996). Berger (1990) e Farlin et al. (1992) hanno utilizzato fluoresceina isotiocianato coniugata con *Pisum sativum* (FITC-PSA) per valutare l'AR negli spermatozoi di maiale, capra e cavallo, mentre la fluoresceina isotiocianato coniugata con l'agglutinina *Arachis hypogea* (FITC-PNA) è stata utilizzata nell'uomo (Cross et al., 1985), nel bovino (Ahluwalia et al., 1990), nel cane (Kawakami et al., 1993), nel maiale (Melendrez et al., 1994) e nel cavallo (Cheng et al., 1996).

Metodi utilizzati per valutare l'AR negli spermatozoi di bufalo comprendono la microscopia elettronica (Chauhan et al., 1997), la colorazione con CTC, la FITC-PSA (Kaul et al., 2001) e la doppia colorazione Trypan blu/Giemsa (Sidhu et al., 1992; Boccia L, 2007).

1.4 La fecondazione in vitro nel bufalo: stato dell'arte

Sebbene l'efficienza del sistema di IVEP nella bufala sia migliorata notevolmente nel corso degli anni, come attestato dalle alte rese di blastocisti ottenute, ovvero di embrioni trasferibili (Gasparrini, 2006), è altrettanto vero che le percentuali di gravidanze a termine ottenute da embrioni crioconservati sono ancora troppo basse perché questa tecnologia possa essere utilizzata routinariamente in campo.

Una delle cause della scarsa efficienza del sistema IVEP nel bufalo è che il sistema è stato sviluppato sulla base di esperienze acquisite in altre specie, facendo riferimento in particolare alla specie bovina.

Le basse percentuali di cleavage riportate nel mondo (Neglia et al., 2003; Gasparrini et al., 2004; Galli et al., 2000) suggeriscono che questa fase sia particolarmente critica nel bufalo. Nella nostra esperienza la minore resa in

embrioni trasferibili è principalmente imputabile al basso tasso di cleavage, come indicato dal fatto che le percentuali di blastocisti calcolate sui divisi risultano sovrapponibili a quelle ottenute nel bovino.

Molteplici sono i fattori che possono condizionare l'efficienza dell'IVF, tra cui emergono la vitalità degli spermatozoi, "l'effetto toro", un ambiente adeguatamente ricreato in vitro per garantire la sopravvivenza dei gameti, il tempismo nell'intervento fecondativo, la presenza di cellule del cumulo, il rapporto numerico spermatozoi-oociti, la durata di co-incubazione dei gameti, l'acquisizione da parte degli spermatozoi della capacità fecondante.

Uno dei fattori principali limitanti l'efficienza IVEP nella specie bufalina è la bassa qualità del seme congelato. Infatti, ci sono dimostrazioni di vari danni al gamete maschile che occorrono dopo crioconservazione: danni a livello dell'acrosoma, rottura di enzimi, alterazioni dello scambio ionico e del pH e perdita della motilità (Meur et al., 1988).

La membrana plasmatica degli spermatozoi di bufalo, infatti, è particolarmente fragile soprattutto nella regione acrosomiale (Galli et al., 1996). Quando si ricorre al seme congelato, è importante selezionare per la fecondazione spermatozoi vivi e con elevata motilità. A questo scopo si può ricorrere alla tecnica dello "Swim up" (Chuangsoongneon e Kamonpatana, 1991; Madan et al., 1994a; Chauhan et al., 1997a; Chauhan et al., 1997b; Nandi et al., 1998; Boni et al., 1994; Bacci et al., 1991; Boni 1994; Neglia et al., 2001), o alla separazione del seme su gradienti di Percoll a diversa densità (Boni et al., 1999; Totey et al., 1993b; Totey et al., 1993a; Gasparrini et al., 2000). Attualmente comunque, la qualità del seme congelato è migliorata, come indicato dal riscontro di parametri di fertilità simili a quelli del seme fresco

(Wilding et al., 2003). Questo dato suggerisce l'esistenza di altre cause che possono incidere negativamente sulla fecondazione.

Il miglioramento della qualità del seme crioconservato non ha tuttavia annullato un altro importante fattore limitante, il cosiddetto "effetto toro", ossia un alto grado di variabilità fra i diversi tori nella capacità di fecondare in vitro (Totey et al., 1993). Poiché solo pochi tori sono caratterizzati da una buona capacità fecondante in vitro (circa il 10%), ne consegue che è necessario uno screening accurato del seme di tori diversi, al fine di individuare un seme idoneo ai programmi di IVF.

Nonostante attualmente siano impiegati diversi test di fertilità, è noto che il test più accurato per individuare un toro adatto all'IVF è quello di saggiare la capacità fecondante in vitro di tori diversi in prove di IVF su oociti aventi la stessa origine.

Una tecnica di colorazione che si presenta facile e veloce è la doppia colorazione Trypan-blue/Giemsa (Kovács e Foote, 1992) che può essere usata per predire la capacità fecondante in vitro di tori bufalini, come mostra la correlazione esistente tra la percentuale di seme vivo con acrosoma intatto allo scongelamento e la resa in blastocisti (Boccia et al., 2007).

La doppia colorazione messa a punto da Kovács e Foote dà la possibilità di verificare la vitalità spermatica, attraverso la valutazione dell'integrità dell'acrosoma, della membrana della testa e della coda e della morfologia spermatica; infatti, dalla combinazione dei due coloranti si ha una distinzione netta delle parti vive da quelle non vitali, nonché dello stato acrosomiale.

E' stato osservato che un effetto positivo sulla fecondazione in vitro è apportato dalla presenza delle cellule del cumulo nella bufala (Pawshe e Totey, 1993) e

nel bovino durante la fase di IVF (Zhang et al., 1995), come dimostrano i dati relativi al cleavage e alla produzione di blastocisti. Probabilmente ciò è dovuto alla capacità delle cellule del cumulo di indurre o, comunque di contribuire alla capacitazione e alla reazione acrosomiale del seme attraverso la secrezione di glicosamminoglicani (Ball et al., 1983) e di aumentare la motilità degli spermatozoi, come dimostrato in campo umano (Tesarik et al., 1990). Le cellule del cumulo, infatti, aiutano la cattura degli spermatozoi attraverso un meccanismo di chemiotassi (Chian et al., 1996), riescono ad aumentare la superficie di contatto tra spermatozoi e oociti (Cox et al., 1993) e selezionano un ridotto numero di spermatozoi capaci di reagire con l'oocita (Carrel et al., 1993).

I terreni più comunemente usati per l'IVF sono il Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate (TALP, Lu et al., 1987), Tyrode's modified medium (MTM; Totey et al., 1992; Totey et al., 1996; Gasparrini et al., 2000; Boni et al., 1994; Parrish et al., 1988) o il "Brackett and Olifant" (BO; Totey et al., 1992; Madan et al., 1994a; Chauhan et al., 1997a; Chauhan et al., 1997b; Chauhan et al., 1997c; Nandi et al., 1998; Bacci et al., 1991). A questi terreni sono aggiunte sostanze quali la caffeina (Totey et al., 1992; Madan et al., 1994b; Madan et al., 1994a; Chauhan et al., 1997b; Chauhan et al., 1997c ; Bacci et al., 1991) e la teofillina (Jainudeen et al., 1993) che migliorano la motilità e la capacità fecondante del seme utilizzato nell'IVF o anche una combinazione di penicillamina, ipotaurina ed epinefrina (Madan et al., 1994b; Totey et al., 1993a; Totey et al., 1996).

La durata della maturazione in vitro (IVM) degli oociti può giocare un ruolo critico per il successivo sviluppo, in quanto un tempo di maturazione inappropriato si traduce in anomalie nella cromatina (Dominko and First, 1997),

invecchiamento degli oociti (Hunter, 1989; Hunter and Greve, 1997) e ridotto sviluppo (Marston and Chang, 1964). Sebbene lo spermatozoo possa comunque penetrare nell'oocita prima del completamento della maturazione (Chian et al., 1992; Niwa et al., 1991), lo sviluppo successivo è generalmente ridotto, e di conseguenza, il tempo ottimale per l'IVF è al completamento della meiosi.

I tempi necessari per la maturazione in vitro degli oociti variano fra le specie, dalle 18-24 ore per il bovino (Sirard et al., 1989; Neglia et al., 2001) alle 36–48 ore nel maiale (Prather and Day, 1998). Nel bovino, è riportato che il tempo ottimale per l'IVF al fine di aumentare il tasso di blastocisti è fra le 18 (Park et al., 2005) e le 24 ore post-maturazione (Ward et al., 2002). Nel bufalo ci sono discrepanze sulle percentuali di maturazione degli oociti in vitro riportate dai diversi autori, con i tassi più alti di oociti in MII osservati fra le 15 (Neglia et al., 2001) e le 24 ore (Yadav et al., 1997).

Un altro parametro che può influire sullo sviluppo embrionale in vitro è la durata della co-incubazione dei gameti durante l'IVF: è stato recentemente dimostrato che il tempo ottimale di co-incubazione spermatozoo-oocita per massimizzare la resa di blastocisti nella bufala è di 16 ore (Gasparrini et al., 2007b), laddove, invece, la riduzione della co-incubazione dei gameti a 8 ore ha determinato una significativa riduzione di cleavage, simile a quanto già riportato nei bovini (Ward et al., 2002; Kochhar et al., 2003). Al contrario, con l'aumento a 20 ore di co-incubazione si è avuta una ridotta produzione di blastocisti. E' opportuno precisare che l'aumento di tale periodo di co-incubazione spermatozoo-oocita è stato correlato ad una maggiore incidenza di polispermia, confermando precedenti osservazioni (Sumantri et al., 1997). Inoltre, in uno studio recente

molto accurato, è stato dimostrato che la durata varia in funzione del toro poiché tori diversi presentano diversa cinetica di penetrazione (Rubessa et al., 2009).

Oltre alle problematiche legate alla vitalità-motilità del seme, si è indagato anche sull'influenza che il rapporto spermatozoi-oociti incubati può avere sull'efficienza dell'IVEP e, grazie agli studi condotti si è giunti a stabilire la concentrazione ottimale di 2×10^6 di spermatozoi per ml: in questo modo, infatti, si hanno buone percentuali di cleavage (65%) senza che aumenti l'incidenza di polispermia, che si presenta quando viene impiegata una concentrazione troppo elevata di spermatozoi (Gasparrini et al., 2002).

I due media più comunemente usati per l'IVF sono il TALP e il BO. In uno studio relativamente recente (Boccia, 2007) è stato dimostrato che, nel bufalo, i risultati migliori in termini di cleavage e resa di blastocisti si ottengono con il medium TALP addizionato di ipotaurina e penicillamina.

Un altro fattore che potrebbe giocare un ruolo importante nella IVF nel bufalo è l'individuazione di un agente idoneo per l'induzione della capacitazione spermatica in vitro. Allo stato attuale l'eparina rimane l'agente capacitante più utilizzato anche in questa specie sebbene diversi studi abbiano individuato altri agenti efficaci.

Ad esempio uno studio è stato eseguito per verificare se il siero di bufala in estro (BES), analogamente a quanto riscontrato nella pecora, potesse esercitare un ruolo importante durante il processo di capacitazione del seme in questa specie. Inoltre gli stessi autori hanno verificato l'efficacia del fluido follicolare (FF) recuperato da un pool di follicoli dominanti.

Risultati promettenti sono stati ottenuti dall'incubazione di spermatozoi bufalini con entrambi i liquidi biologici (Boccia et al., 2005). In effetti, il trattamento di spermatozoi sia con BES che con FF ha portato ad una incidenza significativamente più elevata di reazioni acrosomiali rispetto al trattamento con eparina (84,3, 94,5 vs 50,1% rispettivamente), indipendentemente dal tempo di incubazione.

Nel bovino, è stato dimostrato l'effetto del progesterone sulla capacitazione spermatica (Lukoseviciute et al, 2004). Un effetto simile, seppure con dosaggi e tempi differenti, è stato trovato nella specie bufalina. Nel bufalo, infatti, il progesterone aggiunto al medium di fecondazione in vitro induce la capacitazione degli spermatozoi, e può essere considerato come un agente capacitante alternativo per l'IVF (Boccia et al., 2006a).

È stato pure avvalorato che il trattamento di spermatozoi con nitroprusside di sodio, un noto produttore di ossido nitrico in vitro, migliora l'efficienza della capacitazione di spermatozoi di bufalo rispetto all'eparina, quando l'incubazione è estesa a 2 o 3 ore (Boccia et al., 2007).

Nonostante gli incoraggianti risultati ottenuti negli ultimi anni, sono necessari ulteriori studi e sforzi scientifici per migliorare il sistema di fecondazione in vitro e, quindi, far diventare le diverse strategie applicate alla riproduzione procedimenti di routine nella specie bufalina.

2 PARTE SPERIMENTALE

INTRODUZIONE

Nel bovino è ben noto che spermatozoi di tori diversi differiscono nella abilità di fecondare gli oociti in vitro (Marquant-Le Guienne et al., 1990; Ward et al., 2001); simili differenze sono state evidenziate anche tra spermatozoi provenienti da diversi lotti di seme di uno stesso toro, o addirittura tra paillettes diverse dello stesso lotto (Otoi et al., 1993). Inoltre, Sumantri et al (1997) hanno dimostrato che spermatozoi di tori bovini di razza diversa richiedono tempi di coincubazione con gli oociti differenti per raggiungere il massimo della fertilità. Di conseguenza, il cosiddetto “effetto toro” rappresenta una variabile non trascurabile per l'efficienza del sistema di produzione embrionale in vitro.

Questa problematica è addirittura più accentuata nella specie bufalina, in cui si registra un'estrema variabilità della capacità fecondante tra diversi tori. Ciò comporta la necessità di effettuare un appropriato screening in laboratorio prima di poter utilizzare un dato seme in un programma di IVEP. Si precisa che nella nostra esperienza solo il 10 % dei tori testati risulta idoneo alla IVF (Gasparrini, 2002).

E' noto che nella specie bovina diversi fattori sono in grado di innescare il processo della capacitazione spermatica in vitro ma l'agente più impiegato nei sistemi di IVF rimane l'eparina perché questa sostanza è efficace nella maggioranza dei tori. Anche nel bufalo l'eparina è il fattore capacitante utilizzato più comunemente ma la concentrazione ottimale di questa sostanza varia in funzione del toro utilizzato; ne consegue che è necessario quindi testare in

laboratorio il seme di ogni toro, confrontando concentrazioni spermatiche e concentrazioni di eparina diverse, prima di poterne fare un uso regolare.

A quanto detto consegue che, data la maggiore evidenza di un effetto maschio nel bufalo, anche la risposta ad agenti capacitanti in vitro potrebbe differire tra tori diversi il che comporterebbe che, per ciascun toro, vada scelto oculatamente il fattore più efficace.

In diverse specie è stato dimostrato che gran parte delle influenze ambientali sulla riproduzione dipendono da variazioni della temperatura ambientale e del fotoperiodo (Cagnacci et al., 1996). I meccanismi attraverso i quali la temperatura influenza i fenomeni riproduttivi non sono stati ancora ben definiti, mentre è stato accertato che il meccanismo d'azione del fotoperiodo è soprattutto rappresentato da modificazioni della secrezione notturna di melatonina. La variazione della secrezione notturna di melatonina non dà però origine a delle risposte univoche in tutti gli animali, ed effetti diversi, anche opposti, possono verificarsi in specie animali differenti (Reiter R.J., 1991).

Nelle specie a fotoperiodo negativo come i piccoli ruminanti e la bufala, l'attività riproduttiva è stimolata da una lunga esposizione alla melatonina ed è inibita da una bassa esposizione mentre un pattern contrario è stato osservato nel cavallo.

Diversi effetti positivi sulla sfera riproduttiva sono stati descritti nella pecora. E' stato dimostrato in pecore di razze diverse che la somministrazione di melatonina anticipa l'età pubere (Arendt et al, 1983; English J. et al, 1986); e migliora il tasso di ovulazione e di concepimento (Stellflug J.N. et al, 1988; Lincoln G.A. and Ebling F.J.P., 1985). Inoltre nella pecora di razza aragonese è

stato riportato che, ricorrendo ad impianti di melatonina nella stagione sfavorevole all'attività riproduttiva, è possibile migliorare la vitalità degli embrioni ottenuti nei programmi MOET (Forcada F. et al, 2006)

Gli effetti della melatonina su diversi parametri riproduttivi sono stati descritti anche nell'ariete. La somministrazione di melatonina ad arieti durante la stagione a fotoperiodo positivo determina un incremento delle concentrazioni di LH ed FSH, una riduzione della prolattina ed un aumento del testosterone (Kennaway D.J. et al, 1985; Chemineau P. et al, 1992).

E' stato inoltre riportato che la somministrazione di melatonina agli arieti migliora la congelabilità del seme, riducendo la perdita di enzimi e i danni acrosomiali che si verificano nel corso della crioconservazione (Kaya et al, 2001).

I recettori per la melatonina sono stati trovati in elevate quantità a livello dei tessuti riproduttivi, in particolare dell'epididimo (Li et al, 2008) delle cellule del Leydig (Shiu S. et al, 1996; Sirotkin A. et al, 1997) e degli spermatozoi (Van Vuuren et al, 1992), la qual cosa suggerisce un'azione anche locale di questo ormone.

Nell'ariete è stato riportato che la somministrazione di melatonina determina un incremento del testosterone e degli enzimi del sistema plasminogeno-plasmina, i quali svolgono un ruolo essenziale sulla spermatogenesi, sulla capacitazione e sulla fecondazione (Liu Y.X. et al, 2007). In un altro studio, invece, è stato osservato che la melatonina incrementa l'attività dell'acrosina negli spermatozoi di ariete indipendentemente dalle variazioni dei livelli di testosterone (Kokolis N. et al., 2000).

Esistono, infatti, evidenze che mostrano come il liquido seminale nel bovino subisca una brusca riduzione di qualità nelle stagioni estive (Koivisto et al., 2009).

E' noto che i danni ossidativi da parte dei radicali liberi sono i principali imputati di una bassa resa embrionale in vitro nella maggior parte delle specie (Takahashi et al., 1993; Gianaroli et al, 1996). Gli effetti dello stress ossidativo sono scongiurati in vivo dalla presenza di sostanze antiossidanti localizzate nel fluido oviduttale (Legge and Sellens, 1991) tra cui ritroviamo anche la melatonina.

Dato che la concentrazione di melatonina nel fluido follicolare umano risulta triplicata rispetto a quella plasmatica (Cagnacci et al, 1995), si è ipotizzato che essa possa agire sulla maturazione oocitaria; inoltre poiché il fluido follicolare arriva fino alla porzione ampollare dell'ovidutto, cioè dove avviene la fecondazione, è possibile che agisca anche su questo processo e di conseguenza sui primi stadi di sviluppo embrionale.

Sebbene in letteratura esistano vari studi indicativi di un ruolo della melatonina sulla sfera riproduttiva nelle diverse specie, la maggior parte di essi è stata eseguita somministrando la melatonina agli animali e valutando poi i diversi parametri riproduttivi. Pochi sono, invece, gli studi effettuati utilizzando tale sostanza in vitro.

Studi in vitro hanno dimostrato un effetto positivo sulla maturazione oocitaria nel maiale (Rekkas et al., 2003), mentre nella pecora si è visto un miglioramento della fecondazione e dello sviluppo embrionale (Valasi et al., 2006).

Casao et al (2008) hanno riportato che, nella specie ovina, tale sostanza è capace di aumentare la percentuale di motilità progressiva degli spermatozoi.

L'aggiunta di tale sostanza al medium di coltura ha dato risultati positivi sulla fecondazione e sullo sviluppo embrionale nel topo (Ishizuka et al., 2000) e nel bovino (Poleszczuk et al., 2004).

L'unica esperienza riportata nel bufalo ha dimostrato che l'aggiunta di melatonina ai media di maturazione e coltura si traduce in un incremento del tasso di maturazione, del cleavage e della resa in blastocisti (Manjunatha et al, 2008).

Nei mammiferi il processo di fecondazione ha luogo nell'ovidutto che gioca un ruolo insostituibile nel sostenere gli eventi riproduttivi precoci.

Ne consegue che la possibilità di mimare in vitro l'ambiente tubarico potrebbe essere la strada da percorrere per ottimizzare l'efficienza dell'IVF. Ciò può essere ottenuto o mediante la co-coltura dei gameti con cellule oviduttali o mediante l'individuazione di molecole di derivazione tubarica che intervengono attivamente nel processo fecondativo.

In diverse specie è stato evidenziato che un ottimale sviluppo embrionale in vitro può essere ottenuto coltivando gli embrioni su monostrati di cellule oviduttali (Gandolfi et al., 1992). Appare evidente che le componenti del fluido oviduttale (ODF) influenzano le fasi di maturazione finale dei gameti nonché i processi di sviluppo embrionale.

Diversi studi sono stati condotti in relazione al ruolo che l'ovidutto gioca nella fecondazione, molti di questi nella specie bovina. In particolare, Pollard et al. (1991) hanno analizzato la capacità dell'ovidutto di mantenere la motilità e la capacità fecondante del seme, mediante la co-incubazione di seme congelato/scongelato e cellule epiteliali endosalpingeali. L'incubazione di

spermatozoi bovini con tipi cellulari diversi ha rivelato una maggiore affinità per le cellule dell'ovidutto (bovine oviductal epithelial cells, BOEC). Nello stesso studio è stato riportato che le BOEC determinano iperattivazione negli spermatozoi.

Tra le proteine di origine tubarica che potrebbero essere utilizzate in vitro per massimizzare l'efficienza di IVF si riporta l'osteopontina (OPN), in quanto diverse esperienze condotte in varie specie suggeriscono che tale proteina svolge un ruolo importante nel corso del processo della fecondazione.

L'OPN è una proteina che è stata trovata nel tratto riproduttivo femminile a livello dell'ovidutto, dell'utero e della placenta. Nel topo l'RNAm codificante per l'OPN è stato riscontrato nell'ovaio (Craig and Denhardt, 1991). Nell'uomo la proteina è stata identificata a livello ovarico e dell'endometrio (Brown et al., 1992). Nel bovino l'OPN è presente sia nell'epitelio oviduttale che nell'ODF (Gabler et al., 2003). Gabler et al. (2003) indicano che l'OPN è sintetizzata dall'epitelio oviduttale per poi essere rilasciata nel fluido oviduttale, e che l'ovidutto risulta essere ricco di questa proteina e di diverse integrine che sembrano interagire tra loro per il normale svolgimento degli eventi della riproduzione. Infatti l'OPN è una glicoproteina acida di secrezione con un dominio di legame cellulare composto da GRGDS, glicina-arginina-glicina-aspartato-serina (Oldberg et al., 1986; Wrana et al., 1989), dominio presente in un'ampia varietà di proteine extracellulari che legano membri della famiglia delle integrine (Hynes, 1992).

Le integrine sono presenti sulla superficie di svariate cellule ed hanno, tra le altre funzioni, quella di promuovere l'adesione cellulare. Almeida et al. (1995)

hanno dimostrato che le integrine possono facilitare il processo della fecondazione nei mammiferi agendo sul legame oocita-spermatozoo.

Diverse integrine sono state descritte sulla superficie degli oociti umani e di topo (Fusi et al., 1992; Almeida et al., 1995), sulla membrana degli spermatozoi nell'uomo (Klentzeris et al., 1995) e sull'endometrio della pecora e dell'uomo (Lessey et al., 1992, Johnson et al., 1999). È inoltre stato dimostrato che le integrine intervengono durante la fecondazione (Almeida et al., 1995), facilitando il legame cellula uovo-spermatozoo. La scoperta, quindi, della presenza dell'OPN e di diverse integrine sui tessuti e sulle cellule del tratto riproduttivo maschile e femminile suggerisce che esse collaborino durante l'adesione dello spermatozoo alla cellula uovo e, successivamente, durante l'adesione del trofoblasto all'endometrio.

Inoltre, Killian et al. (1993) e Cancel et al. (1997) hanno dimostrato, con l'uso di anticorpi specifici, che l'OPN è una delle proteine del plasma seminale bovino associata alla fertilità. Henault et al. (1995) hanno dimostrato che le secrezioni delle ghiandole sessuali accessorie (AGF) influenzano le caratteristiche del seme dell'epididimo; infatti l'attività fecondante di quest'ultimo subisce un miglioramento in tori di bassa fertilità quando è trattato con AGF di tori con alta fertilità. Dagli studi di Moura et al. (2006) è poi emerso che tori Holstein di elevata fertilità presentavano più osteopontina nel AGF rispetto ai tori di bassa fertilità. Nei tubuli seminiferi l'OPN, sintetizzata dalle cellule del Sertoli e dalle cellule germinali, è potenzialmente coinvolta nell'adesione e nella migrazione cellulare (Rodriguez et al., 2000).

E' noto che diversi enzimi proteolitici sono coinvolti nell'ambito del processo fecondativo dei mammiferi.

L' acrosina è uno degli enzimi proteolitici localizzato nell' acrosoma degli spermatozoi di mammifero, ed è una proteasi acrosomiale con specificità tripsino-simile. Quest'enzima è associato con la motilità degli spermatozoi (Ioannis et al., 2004), la reazione acrosomiale (Meizel, 1985), il legame alla zona pellucida (Benau e Storey, 1987, 1988), la penetrazione (Fraser, 1982; Brown, 1983) e la reazione di zona (Moller e Wassarman, 1989; Schroeder et al., 1990).

Varie esperienze suggeriscono che un ruolo importante sia giocato dal sistema Attivatore del Plasminogeno/Plasmina, una cascata enzimatica che porta alla conversione extracellulare del proenzima Plasminogeno inattivo nella Plasmina, serin proteasi ad ampio spettro di azione, dando origine alla formazione di un enorme serbatoio di potenziali attività proteolitiche. Il plasminogeno è uno zimogeno abbondante nel plasma e in molti fluidi extracellulari incluso il fluido uterino (Finlay et al., 1983), il fluido ovarico follicolare (Beers, 1975) e il plasma seminale (Kobayashi et al., 1992). La plasmina è una proteasi, come la tripsina, che può agire su un ampio spettro di substrati (Dano et al., 1985) e può degradare le proteine di membrana (Christman et al., 1977).

Nel ratto durante l'ovulazione, gli attivatori del plasminogeno (PAs) sono prodotti dalle cellule della granulosa, la parte interna del follicolo, così come dalle cellule tecali nell'interstizio di follicoli preovulatori (Liu et al., 1996; Ny T. et al., 1985). Nell'ovaio di ratto, la regolazione dei PAs con gonadotropine differisce tra le cellule della granulosa e della teca. La stimolazione ormonale

delle ovaie di ratto si traduce in un aumento dell'attività di PAs in entrambi i tipi cellulari (Canipari et al., 1987)

Anche i COCs e gli oociti denudati possono sintetizzare PAs. Liu et al. (Liu Y.X. et al., 1986) hanno dimostrato che i COCs e gli oociti denudati raccolti da follicoli preantrali di ratto contengono PAs e che l'attività enzimatica degli stessi è stimolata dall'FSH. Ciò suggerisce che le cellule del cumulo potrebbero stimolare l'attività dei PAs per l'oocita (Liu et al., 1986).

Oltre ai PAs, anche il loro inibitore è espresso nel tratto riproduttivo femminile. Nell'ovaio di topo, infatti, è espresso in tutto il periodo periovulatorio, anche se in concentrazioni molto inferiori (Leonardsson G. et al., 1995).

Nel sistema riproduttivo maschile, l'attività delle proteasi, compresa quella del sistema PA, sembra essere molto importante durante la spermatogenesi e per rilascio degli spermatozoi maturi nel lume del tubulo seminifero nei primati (Zhang et al., 1997). Le cellule del Sertoli sono generalmente considerate la principale fonte di PAs nel testicolo di roditore (Lacroix et al., 1977).

La secrezione di PA è controllata da ormoni diversi (Liu et al., 1995; Tolli et al., 1995) e dalle interazioni tra le cellule del Sertoli e quelle di Leydig (Tolli et al., 1995; Liu et al., 1996). Il sistema PA non è solo attivo nei testicoli. Altri ricercatori hanno anche dimostrato la loro presenza nel plasma seminale di varie specie, incluso l'uomo (Smokovitis et al., 1987).

E' stato dimostrato che un tipo di PAs è sintetizzato nella prostata e alcuni studiosi hanno osservato differenze riguardo alla presenza dei differenti tipi sulla membrana acrosomiale esterna e sulla membrana plasmatica di spermatozoi (Reese et al., 1988; Smokovitis et al., 1992). Essendo presenti in

diverse posizioni sulla membrana dello spermatozoo potrebbero avere differenti ruoli nella regolazione delle funzioni dello stesso.

I PAs situati sulla membrana acrosomiale esterna potrebbero partecipare alla penetrazione dello spermatozoo nella zona pellucida, mentre quelli situati sulla membrana plasmatica potrebbero essere coinvolti nella maturazione degli spermatozoi, capacitazione, legame alla zona pellucida e reazione acrosomiale (Liu et al., 1996).

Tra i molti fattori segnalati per innescare la reazione acrosomiale ci sono proteasi endogene presenti sugli spermatozoi come l'acrosina (Meizel and Lui, 1976) e proteasi esogene come la tripsina (Shinohara et al., 1985). Il loro ruolo, non ancora dimostrato, sarebbe quello di idrolizzare la superficie glicoproteica dello spermatozoo e, quindi, destabilizzare la superficie della membrana dello spermatozoo (Meizel, 1985).

Diversi studi forniscono la prova di un ruolo del sistema di attivazione del plasminogeno nella fecondazione dell'oocita, come il rilascio di PAs durante la reazione acrosomiale degli spermatozoi nell'uomo, nel cinghiale, nel toro e nell'ariete (Taitzoglou et al., 1996).

E' stato inoltre riportato che l'aggiunta del Plasminogeno al medium di fecondazione ha aumentato il tasso di fecondazione nel topo (Huarte et al., 1993). In uno studio condotto da Sa et al (2006) nel maiale, si è evidenziato un potenziale ruolo giocato dalla plasmina durante le fasi della fecondazione in vitro.

Guerette et al. (1988) hanno rilevato che l'aggiunta di plasmina a spermatozoi umani, stimola l'attivazione della Fosfolipasi A2, un enzima calcio dipendente,

che è un potente attivatore della reazione acrosomiale, ed è presente negli spermatozoi dei mammiferi (Llanos et al., 1982).

I lisolipidi generati dalla Fosfolipasi A2, come LPC e cis-acidi grassi insaturi sono noti per essere sostanze fusogeniche che accelerano la velocità di reazione acrosomiale in presenza di calcio (Yanagimachi e Suzuki, 1985).

È da notare che solo le proteasi degli spermatozoi (Acrosina e PAs) sono presenti negli spermatozoi come zimogeni inattivi. Il meccanismo fisiologico della loro attivazione è sconosciuto, ma può essere conseguito mediante l'esposizione a proteasi, come la plasmina (Skriver et al., 1982). Questa conversione porterebbe ad un aumento dell'attività delle proteasi endogene e, di conseguenza, ad un aumento dell'attività della Fosfolipasi A2.

Ci sono diverse prove che dimostrano come il sistema PA/Plasmina potrebbe anche svolgere un ruolo nella motilità degli spermatozoi di mammifero. Studi recenti hanno dimostrato, infatti, sia che la plasmina (Smokovitis et al., 1987) sia gli attivatori del plasminogeno, streptochinasi e urochinasi (Hong et al., 1985), quando vengono aggiunti al seme bovino e umano, rispettivamente, inducono un aumento della motilità spermatica.

2.1 SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di approfondire alcuni aspetti della fecondazione in vitro nella specie bufalina.

In particolare, ci siamo prefissi i seguenti obiettivi:

Investigare il cosiddetto “effetto toro”, valutando la risposta del seme di diversi tori bufalini al trattamento con due noti agenti capacitanti (eparina e BES);

Valutare l'efficacia della melatonina nell'indurre la capacitazione in vitro;

studiare l'effetto della co-coltura del seme di bufalo con cellule oviduttali bovine sia sulla induzione della capacitazione, sia sulla penetrazione degli oociti.

Valutare l'effetto dell'OPN sia sul processo di capacitazione spermatica sia sulla fecondazione in vitro, in termini di cleavage e rese embrionali;

Analizzare l'effetto della plasmina sulla reazione acrosomiale degli spermatozoi in vitro.

2.1.1 ESPERIMENTO 1: Valutazione dell'effetto toro sulla risposta alla capacitazione con agenti induttori noti.

Un lavoro preliminare nel bufalo aveva dimostrato che la capacitazione può essere incrementata con grande successo incubando il seme con alcuni fluidi biologici, quali il BES e il FF raccolto da un pool di follicoli dominanti (Boccia *et al.*, 2005). Questo studio era stato condotto su seme proveniente da un singolo toro precedentemente testato per l'IVF, senza dunque considerare le potenziali differenze fra i tori.

E' importante ricordare che, in questa specie, la diffusione in campo dell'inseminazione strumentale e in vitro dell'IVEP sono fortemente penalizzate dall'elevata variabilità della capacità fecondante che si riscontra tra i diversi tori. Tale variabilità incide in misura maggiore nel sistema in vitro. Tra le diverse cause possiamo immaginare, oltre che una differente qualità del seme di partenza, una diversa risposta degli spermatozoi alle sostanze presenti in vitro nei media di IVF.

Lo scopo del presente lavoro è stato, dunque, quello di valutare l'effetto del toro sulla risposta alla capacitazione in vitro indotta da due fattori noti quali l'eparina e il BES, precedentemente utilizzati con successo a questo scopo nella specie bufalina (Boccia, 2007).

Disegno sperimentale

L'esperimento è stato realizzato separatamente su spermatozoi di quattro diversi tori.

Per ciascun toro, gli spermatozoi sono stati separati mediante swim-up e quindi incubati nel medium di fecondazione, TALP modificato (Lu *et al.*, 1987),

addizionato di ipotaurina (0.1mM), penicillamina (0.2mM) ed albumina (6mg/ml) per 2 ore in tre differenti condizioni sperimentali:

- in assenza di agenti capacitanti (controllo)
- in presenza di 0.01mM di eparina
- in presenza del 20% BES

Dopo le 2 ore di incubazione, è stata indotta la reazione acrosomiale con LPC. La valutazione spermatica è stata fatta mediante analisi microscopica ad ingrandimenti 40x e 100x con immersione in olio.

Per ciascun gruppo sono stati valutati circa 100 spermatozoi per replica (3 repliche).

Materiali e metodi

I reagenti utilizzati sono stati forniti dalla ditta Sigma-Aldrich® (Milano, Italia); i semi testati sono stati forniti dal centro tori COFA (Cremona, Italia).

Preparazione della lisofosfatidilcolina (LPC)

E' stata creata una soluzione stock di LPC, miscelando la LPC (L-0906) in metanolo per HPLC, in modo da ottenere una concentrazione di 5mg/ml; sono state allestite, quindi, aliquote da 60µl e conservate a -20° C.

Raccolta BES

I campioni di sangue sono stati ottenuti da bufale in calore e trasportati in condizioni sterili in laboratorio. I campioni di BES, ottenuti dopo centrifugazione, sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'uso.

Preparazione del seme

Seme congelato/scongelato di 4 tori bufalini di razza Mediterranea Italiana è stato trattato separatamente con la procedura dello swim-up per 1 ora, al fine di selezionare gli spermatozoi provvisti di motilità progressiva e morfologicamente normali.

Subito dopo la separazione tramite swim-up, una quota di spermatozoi da ciascun campione è stata fissata e colorata per valutare l'incidenza della perdita acrosomiale nelle cellule non trattate (tempo 0).

Induzione della reazione acrosomiale

La reazione acrosomiale (RA) è stata indotta trattando il seme con LPC, noto agente inducente la RA in spermatozoi capacitati senza comprometterne la vitalità. Per l'utilizzo della LPC, al momento dell'uso, il metanolo contenuto nelle aliquote congelate è stato fatto evaporare sotto azoto gassoso, ed è stato, quindi, aggiunto il terreno Tyrode's Albumine Lactate Pyruvate (TALP) addizionato con ipotaurina (0.1mM), penicillamina (0.2mM) ed albumina (6mg/ml) in modo da ottenere una soluzione di LPC da 600 µg/ml.

La reazione acrosomiale è stata, quindi, indotta mediante esposizione degli spermatozoi per 15 minuti a 60 µg/ml LPC. Per fare questo un volume di 112.5µl di sospensione spermatica di ciascun gruppo sperimentale è stato co-incubato con 12.5µl della soluzione di LPC 600µg/ml previamente equilibrata (operando una diluizione 1:10) a 38.5°C con il 5%CO₂.

La percentuale di spermatozoi che presentavano reazione acrosomiale dopo induzione con LPC, calcolata sui vivi, è stata considerata per valutare indirettamente l'avvenuta capacitazione spermatica.

Fissazione e colorazione degli spermatozoi

Il seme è stato fissato e colorato mediante doppia colorazione Trypan blue/Giemsa (Kovács and Foote, 1992).

Per la colorazione il seme è stato diluito in soluzione fisiologica (0.9% NaCl), con una diluizione 1:10. La soluzione di Trypan blue allo 0.27% è stata ottenuta aggiungendo 2 ml di Trypan blue (0.4%) ad 1 ml di fisiologica (0.9% NaCl). Il fissativo è stato ottenuto aggiungendo 86 ml di una soluzione 1N di HCl a 14ml di una soluzione al 37% di Formaldeide con l'aggiunta di 0.2g di Neutral red purificato. La colorazione Giemsa è stata preparata fresca prima dell'uso aggiungendo 7.5% di una soluzione Giemsa stock (GS-500) ad acqua distillata.

Una goccia di Trypan blue allo 0.27% ed una goccia di seme diluito sono state deposte sul bordo di un vetrino; utilizzando un altro vetrino le due gocce sono state mescolate e strisciate, mantenendo i due vetrini in posizione parallela l'uno all'altro durante lo striscio. In questo modo sono stati preparati due vetrini per ciascun campione. Dopo lo striscio i vetrini sono stati asciugati all'aria in posizione pressoché verticale.

I vetrini sono stati posti in giare sterili contenenti il fissativo per 2 minuti e poi lavati con acqua distillata. I vetrini sono stati, quindi, immersi per diverse ore in giare contenenti il colorante Giemsa. Dopo la colorazione i vetrini sono stati ancora una volta lavati con acqua distillata e lasciati asciugare all'aria verticalmente. Sui vetrini è stato posizionato un coprioggetto con Entellan (Merck 1.07960).

La colorazione ha permesso di evidenziare le seguenti categorie cellulari:

- Vivi con acrosoma: testa e coda vitali con acrosoma intatto (Figura 1a)
- Vivi senza acrosoma: testa e coda vitali senza acrosoma (Figura 1b)

- Morti con acrosoma: testa e coda non vitali con acrosoma intatto (Figura 1c)
- Morti senza acrosoma: testa e coda non vitali e senza acrosoma (Figura 1d)

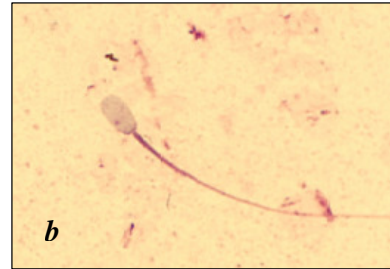
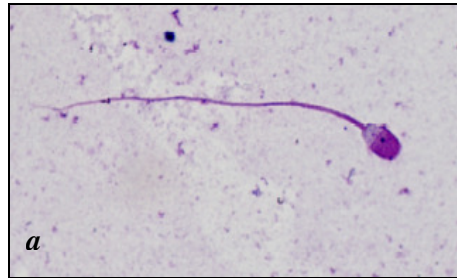


Figura 1a e 1b. Spermatozoi di bufalo vivi con (a) e senza (b) acrosoma

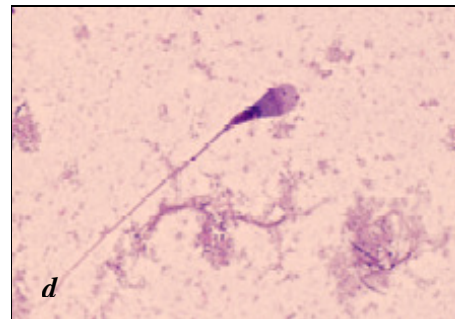
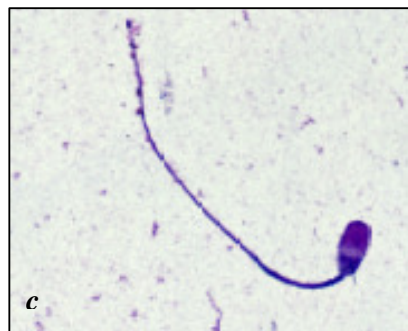


Figura 1c e 1d. Spermatozoi di bufalo morti con (c) e senza (d) acrosoma

Analisi statistica

L'analisi dei risultati per evidenziare le differenze fra i gruppi nelle percentuali di spermatozoi con RA è stata effettuata mediante il test del Chi-quadro.

Risultati e discussione

Sul totale degli spermatozoi analizzati, la perdita dell'acrosoma è stata evidenziata solo nel 4% della popolazione al tempo 0; questo dato può essere

ascritto sia a danni che precedono la morte cellulare, sia ad una capacitazione indotta dal congelamento.

I risultati sulla capacitazione del seme, indicati dalla percentuale di spermatozoi in cui si è osservata reazione acrosomiale, sono mostrati nella Tabella 1.

Tabella1. Percentuale di spermatozoi con reazione acrosomiale (RA) in relazione al toro e all'agente capacitante.

Trattamento	Controllo n (%)	Eparina n (%)	BES n (%)	Totale n (%)
Toro A	220 (6.4) ^{AY}	250 (14.0) ^{aXx}	267 (22.1) ^{AXy}	737 (14.2) ^{Aa}
Toro B	215 (5.1) ^{AY}	246 (16.7) ^{abX}	265 (21.9) ^{AX}	726 (14.7) ^{Aab}
Toro C	199 (9.5) ^{ABY}	203 (22.7) ^{bX}	184 (25.0) ^{bX}	586 (19.1) ^{bc}
Toro D	234 (14.1) ^{BY}	246 (19.1) ^{abY}	206 (35.0) ^{BaX}	686 (22.7) ^{Bc}
Totale	868 (8.8) ^Y	945 (18.1) ^X	922 (26.0) ^Z	

Valori contraddistinti da lettere diverse, all'interno di una stessa colonna, sono diversi significativamente (^{a,b} P<0.05; ^{A,B} P<0.01).

Valori contraddistinti da lettere diverse, all'interno di una stessa riga, sono diversi significativamente (^{x,y} P<0.05; ^{X,Y,Z} P<0.01)

Indipendentemente dal toro testato, il trattamento con il BES ha incrementato significativamente (P<0.01) la capacitazione rispetto all'eparina, che ricordiamo essere il principale fattore capacitante usato nel sistema IVF. Comunque, entrambi i trattamenti hanno aumentato la capacitazione, a conferma di quanto precedentemente osservato da Boccia (2007).

La presenza di una certa percentuale di spermatozoi in cui si evidenzia reazione acrosomiale nei gruppi controllo è dovuta alla presenza nel medium dell'albumina serica bovina (BSA), che agisce come accettore di colesterolo e, di conseguenza, facilita la capacitazione.

Inoltre, in questo studio è stato dimostrato un effetto toro sulla capacitazione *in vitro* del seme, come indicato dalle differenti percentuali di spermatozoi con RA fra i tori, indipendentemente dal trattamento. In particolare, quando è stata usata l'eparina come agente capacitante il toro C ha dato una percentuale più alta di spermatozoi RA rispetto al toro A, con valori intermedi per i tori B e D, mentre, quando è stato utilizzato il BES come agente capacitante è stato il toro D a rispondere maggiormente al trattamento.

I risultati ottenuti confrontando la risposta dei semi di diversi tori a sostanze notoriamente inducenti la capacitazione dimostrano che, nel bufalo, la scelta del toro influenza l'efficacia degli agenti capacitanti; infatti, il BES si è dimostrato superiore all'eparina in due dei quattro tori testati (A e D), mentre per gli altri due tori (B e C) non si sono evidenziate differenze all'interno dei gruppi. D'altra parte l'efficienza dell'eparina nell'indurre la capacitazione *in vitro* è stata dimostrata per tre tori su quattro; nel toro D, infatti, l'eparina non ha apportato alcun incremento della capacitazione, come indicato dalle percentuali simili di spermatozoi con RA rispetto al controllo, mentre il BES ha incrementato significativamente questo parametro.

Possiamo quindi affermare che, al fine di migliorare l'efficienza della fecondazione *in vitro* nel bufalo, risulta importante stabilire l'efficacia di diversi agenti capacitanti in relazione al toro utilizzato.

I risultati ottenuti in questo esperimento suggeriscono, quindi, di effettuare uno screening preliminare dei tori, finalizzato a valutare la risposta a diversi stimoli capacitanti *in vitro* e, quindi, a poter scegliere l'agente di capacitazione in funzione del toro introdotto nel programma IVEP in modo tale da migliorarne la fertilità *in vitro*.

2.1.2 ESPERIMENTO 2: Effetto della melatonina sulla capacitazione in vitro.

Come precedentemente esposto, la melatonina gioca diversi ruoli nella riproduzione. Nell'ariete, la somministrazione di melatonina aumenta l'attività dell'attivatore del plasminogeno (Tsantarliotou M.P. et al., 2007) notoriamente coinvolto nella capacitazione spermatica e nei processi di reazione acrosomiale (Taitzoglou I.A. et al., 1996).

Pochi sono i lavori effettuati in vitro, che hanno perlopiù valutato gli effetti della melatonina sulla motilità spermatica, con risultati piuttosto discordanti. Nel ratto è stato visto che la melatonina, alla concentrazione 10 μ M inibisce la motilità spermatica (Gway and Bernard, 2002); nel criceto, invece, la stessa concentrazione è risultata ininfluente mentre concentrazioni inferiori hanno incrementato l'iperattivazione (Fujinoki et al, 2008).

Un recente lavoro nel bufalo ha dimostrato che la melatonina alla concentrazione 10 μ M e 50 μ M aggiunta durante la maturazione e la coltura in vitro determina un incremento del tasso di maturazione nucleare, del cleavage e della resa embrionale (Manjunatha et al, 2008).

Lo scopo di questo esperimento è stato quello di valutare se la melatonina gioca un ruolo nel processo di capacitazione spermatica nel bufalo.

Disegno sperimentale

L'esperimento è stato realizzato utilizzando un pool di seme derivante da quattro diversi tori testati per l'IVF.

Gli spermatozoi del pool sono stati separati mediante swim-up e quindi incubati nel medium di fecondazione, composto da TALP modificato (Lu *et al.*, 1987), addizionato di ipotaurina (0.1mM), penicillamina (0.2mM) ed albumina (6mg/ml) per 2 ore in 5 differenti condizioni sperimentali:

- in assenza di agenti capacitanti (controllo negativo)
- in presenza di 0.01mM di eparina (controllo positivo)
- in presenza di 10 μ M melatonina
- in presenza di 100 μ M melatonina
- in presenza di 1mM melatonina

Dopo le 2 ore di incubazione a queste condizioni sperimentali, in ciascun gruppo è stata indotta la reazione acrosomiale con LPC, e, quindi, il seme dei diversi gruppi è stato fissato e colorato.

La valutazione delle cellule è stata fatta mediante analisi microscopica (Nikon eclipse 80i) ad ingrandimenti 40x e 100x con immersione in olio.

Per ciascun gruppo sperimentale sono stati valutati circa 100 spermatozoi per replica e l'esperimento è stato ripetuto 6 volte.

Gli spermatozoi sono stati valutati allo scongelamento (N = 921), subito dopo lo swim-up (N = 829) e dopo 2 ore di incubazione nelle diverse condizioni sperimentali, ovvero in assenza di agenti capacitanti (controllo negativo, N = 513), in presenza di eparina (controllo positivo, N = 775), ed in presenza di tre concentrazioni di melatonina (1mM, 100 μ M e 10 μ M; N = 650, 751 e 684, rispettivamente).

Materiali e metodi

I reagenti utilizzati sono stati forniti dalla ditta Sigma-Aldrich® (Milano, Italia) e dalla ditta Cook (Limerick, Ireland); il seme testato è stato fornito dal centro tori COFA (Cremona, Italia).

Preparazione della lisofosfatidilcolina (LPC)

E' stata creata una soluzione stock di LPC, miscelando la LPC (L-0906) in metanolo per HPLC, con una concentrazione di 5mg/ml; sono state allestite, quindi, aliquote da 60µl che sono state conservate a -20° C

Preparazione della melatonina

È stata creata una soluzione 1mM di melatonina (M-5250) con un terreno TALP addizionato di ipotaurina (0.1mM), penicillamina (0.2mM) ed albumina (6mg/ml); successivamente sono state operate diluizioni seriali nel TALP a partire da questa soluzione per ottenere le altre concentrazioni desiderate: 100µM e 10µM. Queste soluzioni sono state poste in incubatore (38.5°C, 5% CO₂/aria) ad equilibrare.

Preparazione del seme

Seme congelato/scongelato di 4 tori bufalini razza Mediterranea Italiana è stato mescolato al fine di annullare l'effetto toro. Questo mix è stato poi trattato con la procedura dello swim-up per 1 ora, al fine di selezionare gli spermatozoi provvisti di motilità progressiva e morfologicamente normali.

Subito dopo la separazione tramite swim-up, una quota di spermatozoi è stata fissata e colorata per valutare l'incidenza della perdita acrosomiale nelle cellule non trattate (tempo 0).

Induzione della reazione acrosomiale

La reazione acrosomiale è stata indotta trattando il seme con LPC, noto agente inducente la RA in spermatozoi capacitati senza comprometterne la vitalità. Per l'utilizzo della LPC, al momento dell'uso, il metanolo contenuto nelle aliquote congelate è stato fatto evaporare sotto azoto gassoso, ed è stato, quindi, aggiunto il terreno TALP addizionato con ipotaurina (0.1mM), penicillamina (0.2mM) ed albumina (6mg/ml) ottenendo una soluzione di LPC da 600 µg/ml.

La reazione acrosomiale è stata, quindi, indotta mediante esposizione degli spermatozoi per 10 minuti a 60 µg/ml LPC. Per fare questo un volume di 112.5µl di sospensione spermatica di ciascun gruppo sperimentale è stato co-incubato con 12.5µl della soluzione di LPC 600µg/ml previamente equilibrata (operando una diluizione 1:10) a 38.5°C con il 5% di CO₂.

La percentuale di spermatozoi che presentavano reazione acrosomiale dopo induzione con LPC, calcolata sui vivi, è stata considerata per valutare indirettamente l'avvenuta capacitazione spermatica.

Fissazione e colorazione degli spermatozoi

Il seme è stato fissato e colorato mediante doppia colorazione Trypan blue/Giemsa (Kovács and Foote, 1992), come descritto nell'esperimento 1.

Analisi statistica

L'analisi dei risultati per evidenziare le differenze fra i gruppi nelle percentuali di spermatozoi con RA è stata effettuata mediante il test del Chi-quadro.

Risultati

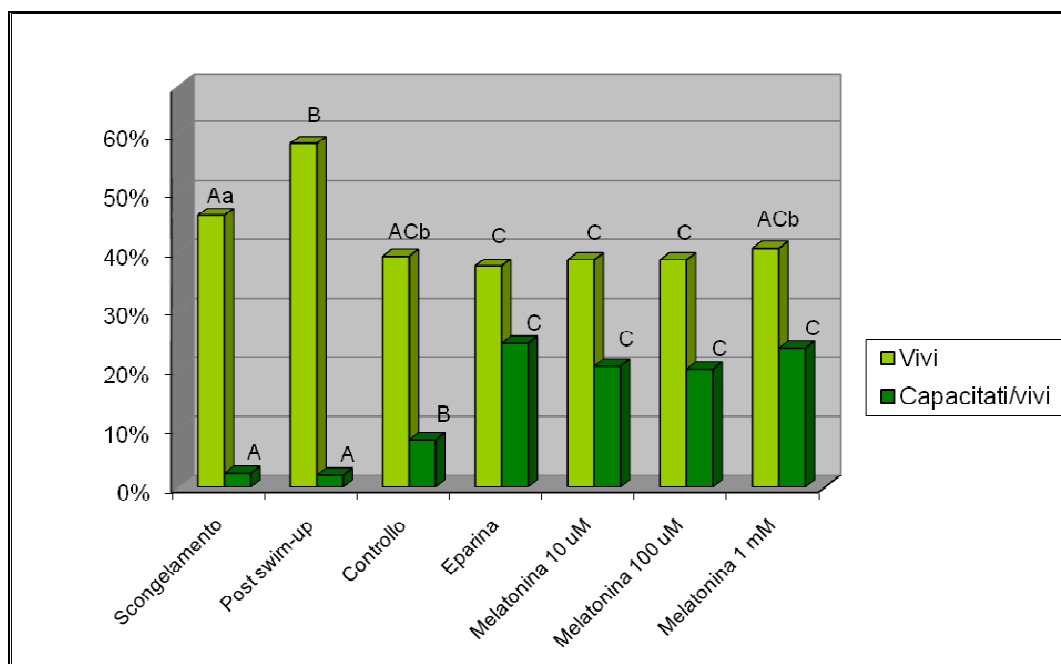
Come si evince dalla Figura 2, la percentuale di spermatozoi sprovvisti di acrosoma è risultata quasi insignificante sia al momento dello scongelamento, sia dopo la selezione del seme mediante swim-up. Ne consegue che la perdita acrosomiale patologica, o “falsa reazione acrosomiale”, imputabile alle procedure stesse della crioconservazione da una parte ed al lavaggio del seme dall'altra, è stata trascurabile.

In tutti i gruppi trattati è stata osservata una riduzione della vitalità spermatica rispetto allo scongelamento e al post swim-up, probabilmente imputabile al maggiore tempo trascorso fino all'allestimento degli strisci (circa 3 ore). Nessuna differenza, invece, è stata osservata riguardo le percentuali di spermatozoi vivi tra i gruppi trattati, per cui le percentuali di capacitati sono state calcolate sul totale degli spermatozoi vivi.

Un dato importante emerso nel corso dell'esperimento è che la melatonina, a tutte le concentrazioni testate, ha incrementato in maniera significativa le percentuali di spermatozoi capacitati rispetto al controllo. All'interno dei gruppi trattati con melatonina non sono emerse differenze tra le concentrazioni impiegate; a tale proposito ricordiamo che il range di concentrazioni impiegato (10 μ M-1mM) è stato scelto sulla base dei dati disponibili in letteratura.

Tuttavia l'effetto promovente la capacitazione è risultato sovrapponibile a quello riscontrato dopo esposizione ad eparina, che è l'agente universalmente utilizzato per la capacitazione in vitro del seme nella maggior parte delle specie.

Figura 2. Influenza di diverse concentrazioni di melatonina sulla percentuale di spermatozoi capacitati (con RA dopo induzione con LPC) rispetto all'eparina e al controllo



^{A,B,C} Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0.01$

^{a,b} Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0.05$

La mancata evidenziazione di un effetto tossico alla concentrazione più elevata di melatonina (1mM) consiglierebbe di testare, in studi successivi, anche concentrazioni superiori per individuare quella ottimale per la specie.

E' opportuno specificare che anche nel gruppo controllo le percentuali di spermatozoi capacitati sono risultate superiori sia rispetto al tempo dello scongelamento, sia dopo lo swim-up. Ciò può essere spiegato dalla presenza nel terreno base di BSA, che essendo un accettore di colesterolo, può innescare il processo della capacitazione.

Discussione

I risultati di questo esperimento hanno dimostrato che la melatonina è un valido agente inducente la capacitazione in vitro nel bufalo, in quanto alle concentrazioni testate questa sostanza ha mostrato un'efficacia paragonabile a quella dell'eparina, il fattore universalmente utilizzato a tale scopo nella maggioranza delle specie domestiche.

E' possibile ipotizzare che l'effetto promovente la capacitazione sia riconducibile all'azione della melatonina sulla riduzione dell'ossido nitrico (NO). E' noto che la melatonina influenza negativamente la produzione di AMPc e di NO nelle cellule e nei tessuti (Reppert et al, 1994-95; Starkey, 1996; Frungieri et al, 2005). E' anche noto che l'AMPc è molto importante per le funzioni spermatiche, in quanto la motilità e la capacitazione sono eventi AMPc-dipendenti (Reppert et al, 1994-95; Starkey S.J., 1996; Vanecek et al, 1998; Browning et al, 2000).

In uno studio precedente l'impiego di nitroprusside di sodio, un noto produttore di NO in vitro si era rivelato efficace nell'innescare il processo di capacitazione nel bufalo (Boccia et al, 2007).

D'altra parte è stato suggerito che la ossido nitrico sintetasi (NOS) sia coinvolta nella regolazione della capacitazione a basse concentrazioni (Iwasaki e Gagnon, 1992; Agarwal et al, 2008), in quanto alte concentrazioni di NO influenzano negativamente le funzioni spermatiche (O' Flaerty et al., 2006; Argawall et al., 2008; Lamirande et al., 2008) mentre basse concentrazioni di NO stimolano la cascata delle MAP chinasi e la fosforilazione delle proteine tirosiniche durante la capacitazione spermatica (Lamirande et al, 2008).

Questo effetto è stato osservato a tutte le concentrazioni testate e non è stato evidenziato un effetto tossico neanche alla maggiore concentrazione (1mM), suggerendo di ampliare ulteriormente il range in studi successivi per individuare la concentrazione ottimale d'impiego.

Poiché nel nostro studio è stato utilizzato un pool di materiale seminale proveniente da quattro tori diversi sarebbe interessante in studi futuri valutare l'effetto capacitante di questa sostanza in funzione del toro utilizzato e della stagione di prelievo.

I risultati di questo lavoro hanno delle potenziali rilevanti implicazioni considerando, da una parte la stagionalità della specie, e dall'altra la forte variabilità nella capacità fecondante di tori bufalini diversi. E' ipotizzabile, infatti, che le concentrazioni di melatonina nel plasma e nel liquido seminale varino in funzione della stagione di prelievo e del soggetto, e che un pretrattamento del seme con la melatonina prima della crioconservazione o comunque prima della fecondazione in vitro possa migliorare la capacità fecondante dei tori ipofertili nella stagione a fotoperiodo positivo.

2.1.3 ESPERIMENTO 3: Effetto delle BOEC sulla capacitazione e sulla fecondazione in vitro.

E' stato dimostrato che il fluido oviduttale induce la capacitazione degli spermatozoi bovini (McNutt T.L. and Killian G.J., 1991).

Lo scopo di questo lavoro è stato, quindi, quello di valutare se una co-coltura di spermatozoi di bufalo con cellule oviduttali bovine (BOEC) promuova la capacitazione in vitro del seme di bufalo. Contestualmente si è voluta studiare l'influenza delle BOEC sulla capacità fecondante in vitro degli spermatozoi di bufalo: in considerazione delle difficoltà nel reperimento di oociti di bufalo, però, si è deciso di ricorrere alla fecondazione eterologa, utilizzando nella fecondazione con seme bufalino gli oociti di bovino maturati in vitro, tecnica già precedentemente sperimentata con successo per ovviare a tale problema (Wilding M., 2003). La capacità fecondante è stata poi valutata in base alle percentuali di cleavage (divisione a 2 cellule) e di penetrazione spermatica.

Disegno sperimentale

In dieci piastre contenenti un monostrato di Cellule Oviduttali Bovine (BOEC) è stata inoculata una quantità nota di spermatozoi, tale da rispettare una concentrazione iniziale di 1×10^6 spermatozoi/ml.

Di tali piastre, alcune sono state impiegate per la valutazione della capacitazione dopo 3 ore e le altre dopo 6 ore dall'inizio della co-incubazione seme-BOEC in atmosfera gassosa controllata.

Trascorse rispettivamente 3 e 6 ore, il seme co-incubato è stato prelevato dalle piastre, centrifugato ed è stata effettuata un'ulteriore conta alla camera di Burkner, allo scopo di risalire alla quota di spermatozoi legati/non-legati.

Allo stesso tempo, una quota di seme è stata messa in provette falcon contenenti rispettivamente TALP addizionato di BS ed eparina (0.01mM) nelle medesime condizioni di incubazione succitate, ma in assenza di cellule BOEC (controllo).

Infine per ciascun gruppo è stata indotta la reazione acrosomiale con il calcio ionoforo rispettivamente a ciascuno dei tempi prefissati (per 3 e 6 ore) ed il seme è stato fissato e colorato.

Quindi, sono stati utilizzati 3 GRUPPI SPERIMENTALI:

- TALP + eparina + BS con BOEC in piastre con biofilm (1×10^6 /ml)
- TALP - eparina + BS con BOEC in piastre con biofilm (1×10^6 /ml)
- TALP + eparina + BS in falcon (1×10^6 /ml)

Gli spermatozoi sono stati valutati dopo fissazione e colorazione a diversi tempi: allo scongelamento (N = 110), al post-Percoll (N = 112) e nei diversi gruppi sperimentali, in seguito ad esposizione al calcio ionoforo come induttore della reazione acrosomiale (controllo, BOEC con eparina, BOEC senza eparina) a 3 ore (N = 70, 225 e 204, rispettivamente) e a 6 ore (N = 108, 117 e 108, rispettivamente)

Per lo studio delle BOEC in fecondazione, invece, sono state create quattro differenti condizioni sperimentali per la successiva fecondazione eterologa, in cui oociti bovini maturati in vitro sono stati fecondati con seme bufalino preincubato o meno (per 6 ore) in presenza/assenza di BOEC.

A tal fine, sono state allestite gocce da 100µl di IVF TALP in piastre petri, in cui il seme è stato aggiunto al momento dell'IVF insieme agli oociti (gruppo controllo 0h) e 6 ore prima della stessa, ovvero al momento dell'allestimento delle gocce (gruppo controllo -6h).

Inoltre sono state allestite altrettante gocce di 100µl di IVF TALP in piastre contenenti un monostrato di cellule tubariche bovine, in cui il seme è stato aggiunto al momento dell'IVF insieme agli oociti (gruppo BOEC 0h) e 6 ore prima della stessa, ovvero al momento dell'allestimento delle gocce (gruppo BOEC 6h).

Quindi gli oociti bovini maturati in vitro sono stati ripartiti a random nei seguenti gruppi sperimentali:

- controllo 0h: IVF normale (n= 104);
- controllo -6h: IVF con seme preincubato per 6 ore (n=108)
- BOEC 0h: IVF su monostrato di BOEC (n=104)
- BOEC -6h: IVF con seme preincubato su BOEC per 6 ore (n=106)

Il tasso di cleavage è stato valutato a 48 ore dalla IVF. Inoltre tutti gli oociti inseminati (sia quelli evidentemente divisi, sia quelli apparentemente indivisi) sono stati fissati e colorati per accertare il tasso di penetrazione spermatica.

Materiali e metodi

I reagenti utilizzati sono stati forniti dalla ditta Sigma-Aldrich® (Milano, Italia), se non diversamente specificato; il seme testato è stato fornito dal centro tori COFA (Cremona, Italia).

Coltura delle cellule oviduttali

Sei giorni prima dell'esperimento previsto, sono stati prelevati al macello ovidutti da vacche in fase preovulatoria di un normale ciclo estrale, sulla base della presenza di corpo luteo regressivo e follicolo dominante, e trasportati in laboratorio entro 6 ore dal prelievo in soluzione fisiologica antibiotata con kanamicina in ragione di 150mg/L alla temperatura di 4 °C.

Una volta in laboratorio, ogni coppia di tube è stata ripulita dal tessuto connettivo con lame sterili, rimuovendo fimbria e corno corrispondente, e disinfettata mediante un passaggio veloce in etanolo all'80% (Carlo Erba) e tre passaggi sequenziali in soluzione fisiologica antibiotata con un complesso penicillina-streptomicina e amfotericina al 4%, tenendo entrambe le estremità serrate mediante pinzette autoclavate e sterilizzate alla fiamma.

Ogni coppia di tube è stata posta in una piastra Petri contenente 8 ml di Medium 199 (M-4530), addizionato del complesso penicillina-streptomicina, amfotericina B e tamponato con hepes 20mM. Successivamente, mediante uno "squeezing" delle tube con una coppia di vetrini sono state prelevate le cellule tubariche grazie alla semplice pressione esercitata con la spremitura del vetrino lungo la tuba. Questo procedimento è stato eseguito per 10 tube (5 animali).

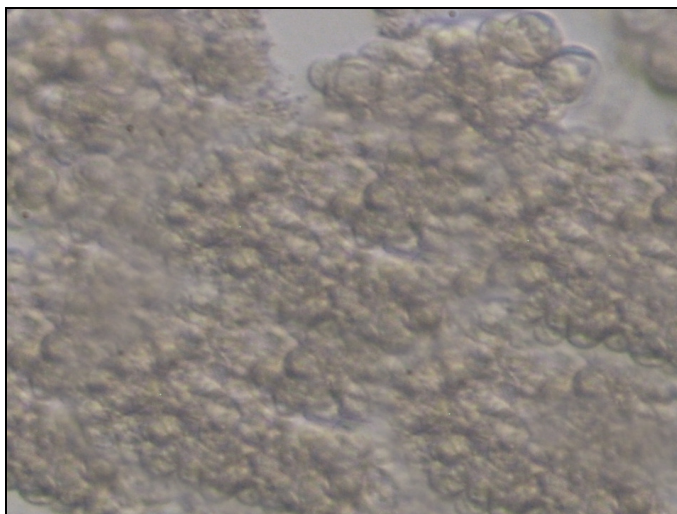
Sono state recuperate, quindi, le sospensioni cellulari mediante due centrifughe a 800 x *g* per 8 minuti, utilizzando per la seconda centrifuga lo stesso terreno.

Per verificare l'effetto delle BOEC sulla capacitazione una parte del pellet ottenuto dalla seconda centrifuga è stato inoculato in piastre con biofilm (Falcon-BD 353003) contenenti Medium 199 addizionato del 10% di siero fetale bovino (FCS) e del complesso penicillina-streptomicina e amfotericina B, conservando un rapporto di 1:10 tra pellet e il mezzo.

Per verificare, invece, l'effetto delle BOEC sulla fecondazione il pellet ottenuto dalla seconda centrifuga è stato inoculato in piastre con biofilm (Falcon-BD 353003) in gocce da 100µl, coperte da olio minerale, contenenti Medium 199 addizionato del 10% di siero fetale bovino (FCS) e del complesso penicillina-streptomicina e amfotericina B, sempre conservando un rapporto di 1:10 tra pellet e mezzo.

Ogni due giorni è stato effettuato il cambio di terreno per ogni piastra, allo scopo di allontanare le cellule morte e dare la possibilità alle cellule rimaste in sospensione di potere aderire al biofilm. Contestualmente è stato osservato il battito ciliare delle cellule, parametro di vitalità cellulare, tramite microscopio invertito (Nikon Diaphot 300) e sono stati valutati lo sviluppo del monostrato e l'assenza di contaminazioni. Dopo circa sei giorni si è osservata la confluenza delle cellule tubariche (Figura 3).

Figura 3. monostrato di BOEC



Preparazione del seme

Spermatozoi congelati/scongelati di un toro bufalino precedentemente testato per l'IVF sono stati trattati con la procedura dei gradienti di Percoll, impiegando due gradienti, 80% e 45%, per ottenere una frazione viva e mobile di spermatozoi. Dopo questa separazione, è stata eseguita una conta spermatica alla camera di Burker.

Cambio di medium nelle piastre BOEC

Il giorno della prova il medium di coltura utilizzato fino al raggiungimento della confluenza del monostrato è stato sostituito con Tyrode Albumine Lactate Pyruvate (TALP, Lu et al., 1987), addizionato di ipotaurina (0.1mM), penicillamina (0.2mM) e Siero bovino (BS). Nella metà delle piastre è stata aggiunta a questo TALP anche l'eparina (0.01mM).

Preparazione Calcio ionoforo A23187

Il calcio ionoforo è stato disciolto in dimetilsulfossido (DMSO), in ragione di 50mg/ml. La soluzione madre 20mM così ottenuta è stata diluita in ragione di 1:1000 in TALP rispettivamente in presenza e assenza di eparina. La working solution derivante, di 20 μ M, è stata ulteriormente diluita 1:1 con il seme per ottenere la concentrazione finale di utilizzo di 10 μ M.

Fissazione e colorazione degli spermatozoi

Il seme è stato fissato e colorato mediante doppia colorazione Trypan blue/Giemsa (Kovács and Foote, 1992), come descritto nell'Esperimento 1.

Recupero degli oociti immaturi ed IVM

Il giorno prima dell'esperimento, presso un macello locale sono state raccolte le ovaie bovine che sono state trasportate in laboratorio in soluzione fisiologica salina (0.9% NaCl) antibiotata con 150mg/L di kanamicina, alla temperatura di 30-35°C, entro le 4 ore dalla macellazione.

I complessi cumulo oocita (COC) sono stati aspirati dai follicoli dal diametro di 2-8 mm, visibili sulla superficie dell'ovaio, utilizzando un ago di 19 Gauge collegato ad una pompa di aspirazione operante a pressione negativa controllata (40-50 mmHg).

Il fluido follicolare è stato esaminato in piastre Petri, dove si è proceduto con la valutazione morfologica dei COC così raccolti e loro selezione: solo quelli caratterizzati da cumulo compatto e non atresico e citoplasma omogeneo sono stati utilizzati per la fase sperimentale.

Per la maturazione in vitro degli oociti si è utilizzato un terreno commerciale, il TCM 199, tamponato con 25mM di bicarbonato di sodio, addizionato di 5µl/ml di gentamicina, 4µl/ml di L-glutamina e supplementato con 2µl/ml di FSH, 10µl/ml di LH e del 15% di BS (TCM IVM).

I COC selezionati, previo abbondante lavaggio in TCM199 tamponato con 25mM di Hepes e 2mM di bicarbonato di sodio e addizionato con 2mM di sodio piruvato, 1mM di L-glutamina, 10µl/ml di amfotericina B e 540µg/ml di eparina e 5% BS (TCM-Aspiration), completato da un lavaggio nel terreno finale di maturazione, sono stati posti in gocce di maturazione di TCM IVM da 50µl (10 COC/goccia) dello stesso medium, coperte di olio minerale.

La IVM è stata effettuata alla temperatura di 39°C, in atmosfera gassosa controllata con il 5% di CO₂, in aria umidificata ed ha avuto durata 22 ore.

Preparazione delle piastre BOEC per IVF: cambio di medium nelle piastre

Il giorno della prova, verificato il raggiungimento della confluenza del monostrato di cellule tubariche nelle gocce contenute nelle piastre con biofilm, il medium di coltura delle BOEC è stato sostituito con il medium Tyrode Albumine Lactate Pyruvate (TALP, Lu et al., 1987), addizionato di eparina (0.01mM), ipotaurina (0.1mM), penicillamina (0.2mM) e siero bovino (BS).

Fecondazione eterologa

Il giorno della prova, sono state effettuate due selezioni del seme differite di sei ore, al fine di creare le 4 condizioni sperimentali:

- seme pre-incubato per 6 ore in TALP in assenza di monostrato BOEC
- seme pre-incubato per 6 ore in TALP in presenza di monostrato BOEC
- seme non pre-incubato, in assenza di monostrato BOEC
- seme non pre-incubato, in presenza di monostrato BOEC

In entrambi i casi, gli spermatozoi utilizzati per la fecondazione *in vitro* sono stati ottenuti da seme congelato/scongelato di un toro bufalino precedentemente testato per la IVF, e separato su gradienti di Percoll (45% e 80%). Dopo questa selezione, è stata eseguita una conta spermatica alla camera di Burker, ed il pellet ottenuto è stato risospeso in TALP in modo da ottenere una concentrazione finale di 2×10^6 spermatozoi/ml nel terreno di fecondazione.

Il seme selezionato durante la prima separazione è stato inoculato nella metà delle gocce, allestite con il medium di fecondazione (TALP), in cui era presente il monostrato BOEC e nella metà delle gocce in cui le BOEC erano assenti (controllo).

Il seme, quindi, è stato pre-incubato per 6 ore in presenza/assenza di BOEC, prima dell'aggiunta in queste gocce dei COC.

Il seme selezionato durante la seconda separazione è stato inoculato nelle restanti gocce, allestite con il medium di fecondazione (TALP), in cui erano presenti/assenti le BOEC, contemporaneamente ai COC.

I COCs sono stati prelevati dal medium di IVM, lavati in TALP, tamponato con bicarbonato di sodio e addizionato di penicillamina, ipotaurina ed epinefrina (PHE), eparina e BS e smistati nei 4 gruppi sperimentali.

Valutazione e fissazione oociti

Trascorse 48 ore dalla IVF, è stata stimata la percentuale di cleavage e tutti gli oociti/presunti zigoti sono stati raccolti e denudati mediante vortex per 2 minuti.

Sono stati, quindi, privati della zona pellucida mediante digestione enzimatica con pronase (2mg/ml) in TCM199 tamponato con Hepes, lavati in TCM199 tamponato con Hepes e montati su vetrini. I vetrini sono stati, quindi, lasciati asciugare all'aria e fissati in etanolo assoluto overnight. Una volta estratti dal fissativo, si è effettuata una colorazione con 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI, Vector®). Il giorno successivo è stato possibile eseguire l'analisi dei vetrini allestiti al microscopio a fluorescenza (Nikon eclipse 80 i).

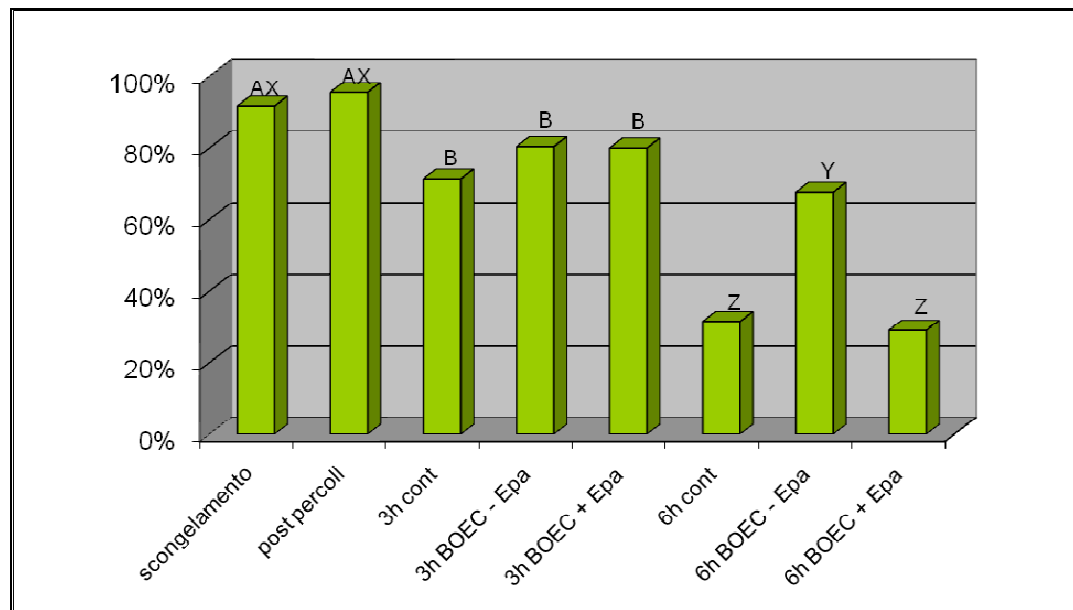
Analisi statistica

L'analisi dei risultati per evidenziare le differenze fra i gruppi nelle percentuali di spermatozoi con RA, così come nelle percentuali di cleavage, penetrazione ed embrioni a stadio avanzato, è stata effettuata mediante il test del Chi-quadro.

Risultati

Come si osserva nella Figura 4, la vitalità spermatica dopo 3 ore di incubazione si è ridotta in tutti i gruppi rispetto alle condizioni di partenza, cioè rispetto sia al momento dello scongelamento (92%), sia alla fine della separazione mediante percoll (96%), ma non sono emerse differenze statisticamente rilevanti tra i gruppi sperimentali (71, 80 e 80%, rispettivamente, nei gruppi controllo, BOEC - eparina e BOEC +eparina)

Figura 4. Percentuali di vitalità del seme incubato in presenza di BOEC con e senza eparina e nel controllo a 3 e a 6 ore

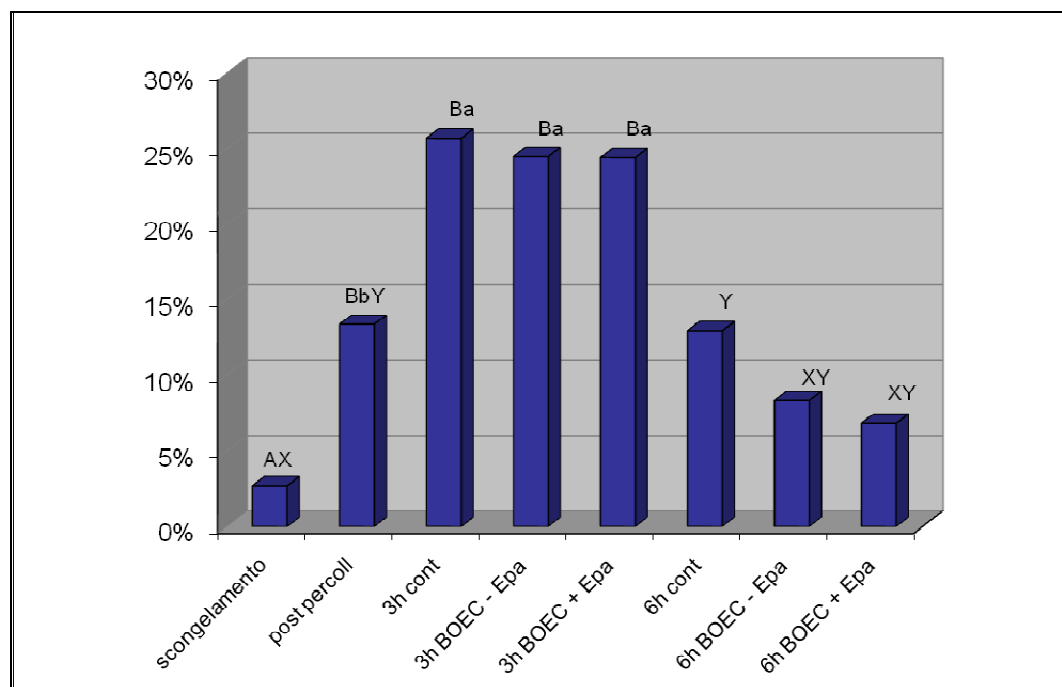


A,B,C Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0.01$
X,Y,Z Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0.01$

Dopo 6 ore di incubazione si è osservato un ulteriore decremento ($P < 0.01$) della vitalità spermatica rispetto alle condizioni di partenza. Tuttavia, nel gruppo BOEC senza eparina la vitalità si è mantenuta più elevata rispetto ad entrambi gli altri gruppi in cui l'eparina era presente (68 vs. 32 e 29%).

I risultati che si riferiscono all'induzione della capacitazione sono mostrati nella Figura 5.

Figura 5. Percentuali di RA/totale degli spermatozoi incubati in presenza di BOEC con e senza eparina e nel controllo a 3 e a 6 ore



A,B,C Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0.01$

a,b Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0.05$

X,Y,Z Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0.01$

Una differenza nella percentuale di spermatozoi con RA, calcolata sul totale delle cellule, si evidenzia già tra il momento dello scongelamento e quello del post-percoll (2.7 vs 13.4%, rispettivamente).

L'incubazione degli spermatozoi per 3 ore con eparina e con le BOEC, in presenza/assenza di eparina, ha avuto un effetto promuovente la capacitazione, come attestato dall'incremento significativo della percentuale di RA dopo induzione con calcio ionoforo, rispetto sia allo scongelamento ($P < 0.01$), sia al post-percoll ($P < 0.05$).

L'incubazione del seme per 3 ore sulle BOEC, in presenza/assenza di eparina, ha, comunque, fornito percentuali di RA sovrapponibili a quelle ottenute con la sola eparina (24 e 25 vs 26%, rispettivamente).

Dopo 6 ore di incubazione non è stato più possibile evidenziare un effetto sulla capacitazione: infatti, le percentuali di RA, calcolate sul totale, sono state inferiori rispetto al tempo precedente in tutti i gruppi sperimentali (13, 7 e 8%, rispettivamente, per la sola eparina e per BOEC in presenza/assenza di eparina) e simili a quelle registrate nel gruppo post-percoll.

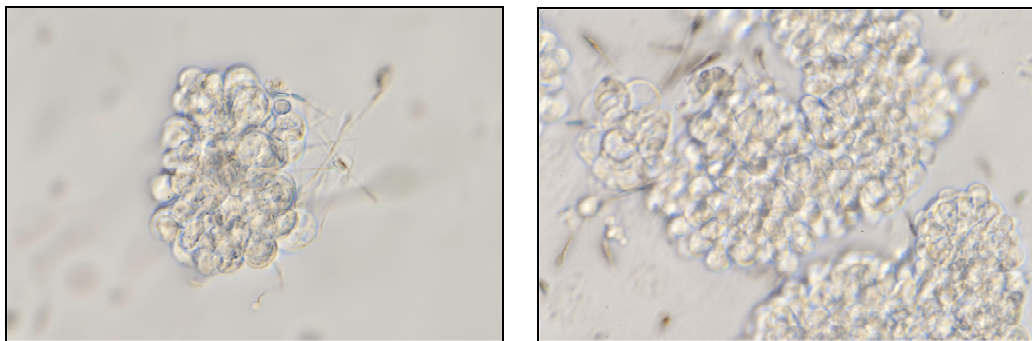


Figura 6. Spermatozoi incubati con BOEC

A ciascun tempo è stata anche esaminata la motilità spermatica.

La motilità spermatica subito dopo la separazione con il percoll era molto elevata (90%). Già a 3 ore è stato osservato un decremento significativo della motilità ma in entrambi i gruppi BOEC questo parametro si è mantenuto a livelli più elevati rispetto al gruppo IVF con eparina (60% nei due gruppi BOEC vs 45% del gruppo controllo). Dopo 6 ore di incubazione è stata descritta

un'ulteriore diminuzione della motilità e non sono state più evidenziate differenze tra i gruppi (circa 50% nei tre gruppi).

Vale la pena riferire che sia a 3 sia a 6 ore di incubazione all'osservazione microscopica la maggior parte degli spermatozoi ancora legati risultava mobile; tuttavia, non è stato possibile in questo studio monitorare tale parametro.

In seguito alla IVF eterologa, la più elevata percentuale di cleavage è stata osservata nel gruppo di oociti fecondati direttamente sul monostrato di BOEC (BOEC 0 h), mentre la più bassa è stata registrata nel gruppo controllo, con valori intermedi in entrambi i gruppi in cui il seme era stato preincubato per 6 ore (controllo -6h e BOEC -6h) prima della IVF (Figura 7). Tuttavia, è opportuno precisare che tale differenza non è risultata statisticamente significativa.

Figura 7. Percentuali di cleavage ottenute dopo IVF eterologa con seme bufalino preincubato o meno per 6 ore, in presenza/assenza di BOEC

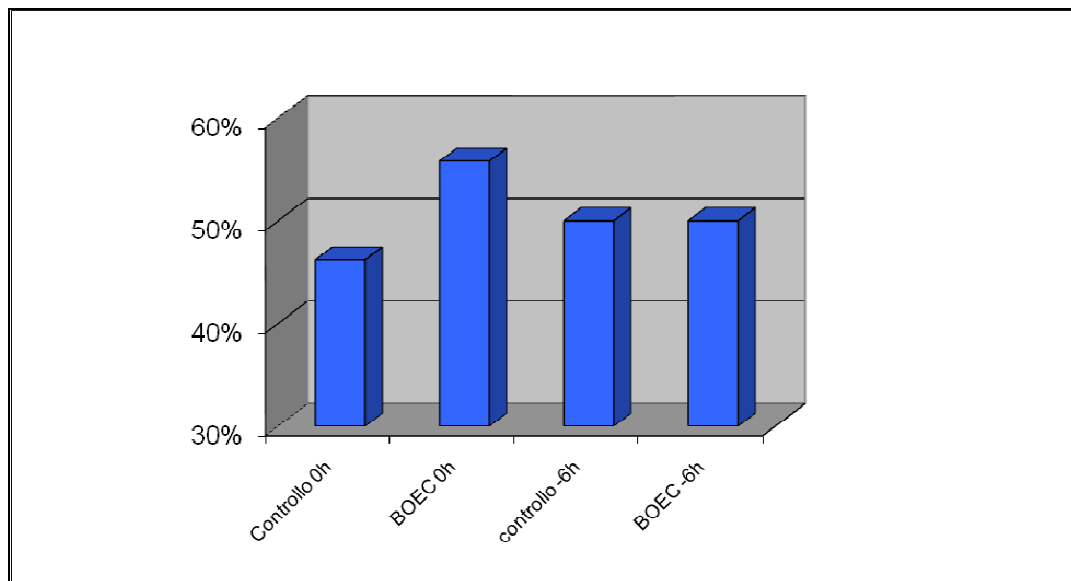
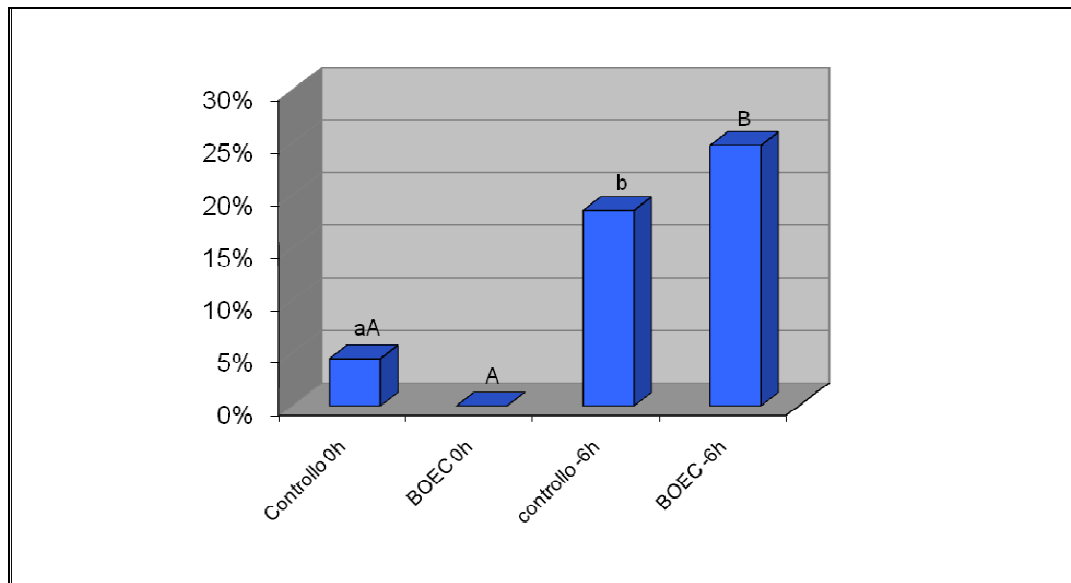


Figura 8. Percentuali di embrioni a stadio avanzato di sviluppo (> di 4 blastomeri) ottenute dopo IVF eterologa con seme bufalino preincubato o meno per 6 ore, in presenza/assenza di BOEC



A,B, Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0.01$

a,b Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0.05$

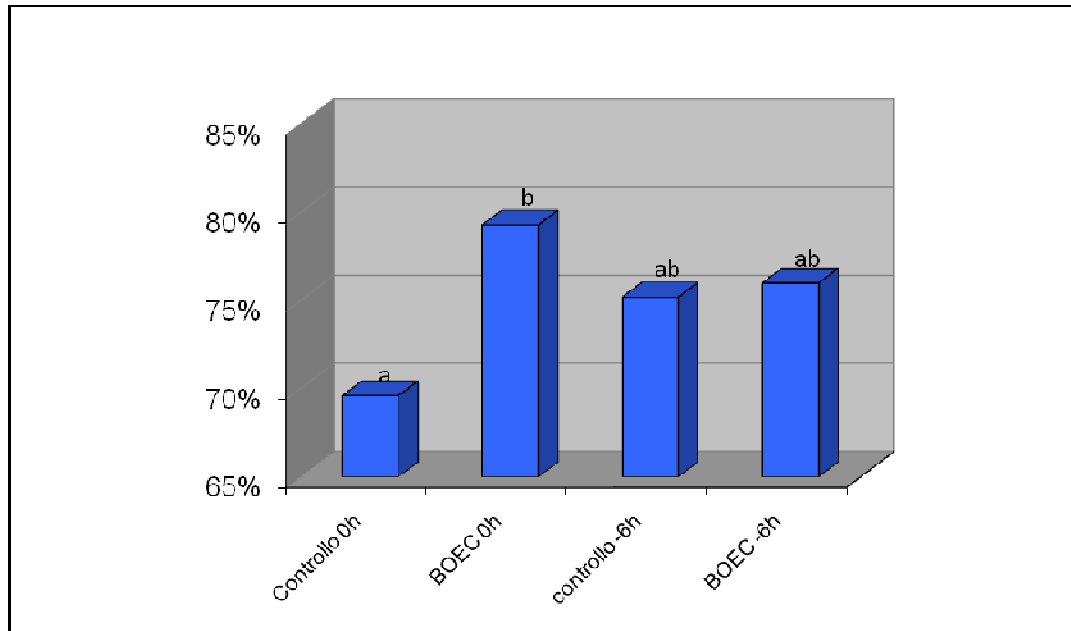
Un dato interessante emerso nel corso della prova è che nei due gruppi di fecondazione in cui il seme era stato pre-incubato per 6 ore prima della IVF, la percentuale di embrioni ad uno stadio più avanzato di sviluppo (> di 4 blastomeri) è aumentata significativamente ($P < 0.05$) e che tale differenza è stata maggiore ($P < 0.01$) nel gruppo pre-incubato sulle BOEC (Figura 8).

Trattandosi di una fecondazione eterologa, abbiamo ritenuto utile fissare i presunti zigoti per poter accertare l'effettiva penetrazione spermatica.

Se consideriamo come parametro di avvenuta fecondazione la penetrazione monospermica, l'andamento è stato analogo a quello descritto per il cleavage ma, come illustrato dalla Figura 9, in questo caso emergono differenze significative tra i gruppi, con la più elevata penetrazione riscontrata nel gruppo fecondato su monostrato di BOEC rispetto al controllo ($P < 0.05$) e valori

intermedi nei due gruppi di fecondazione in cui il seme era stato previamente incubato nel medium di IVF e sul monostrato di BOEC

Figura 9. Tasso di penetrazione monospermica (%) osservato dopo IVF eterologa con seme bufalino preincubato o meno per 6 ore, in presenza/assenza di BOEC

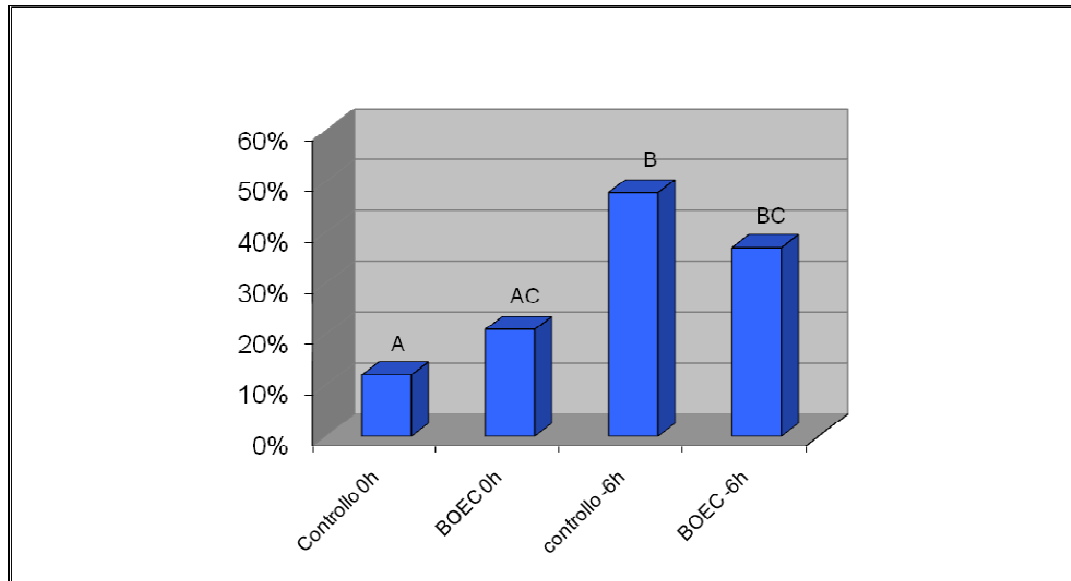


^{a,b} Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0.05$

Non sono emerse, invece, differenze nelle percentuali di polispermia tra i gruppi sperimentali (4.0, 2.9, 5.7 e 6 % rispettivamente nei gruppi controllo 0h, BOEC 0h, controllo 6h e BOEC 6h).

La valutazione dello stato nucleare eseguita dopo fissazione degli zigoti ha consentito di evidenziare meglio gli embrioni più avanzati, ovvero quelli in cui si erano già formati almeno 4 nuclei.

Figura 10. Percentuali di embrioni a stadio avanzato di sviluppo (> di 4 nuclei) osservate dopo IVF eterologa con seme bufalino preincubato o meno per 6 ore, in presenza/assenza di BOEC



A,B,C Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0.01$

Da questa analisi è emerso che la più elevata percentuale di embrioni avanzati è stata riscontrata nel gruppo in cui il seme era stato pre-incubato nel medium di IVF rispetto ai due gruppi in cui la IVF veniva eseguita direttamente dopo processazione del seme, senza una preventiva incubazione, mentre valori simili sono stati trovati nel gruppo in cui il seme veniva pre-incubato su BOEC per 6 ore (Figura 10). In quest'ultimo gruppo la percentuale di embrioni con più di 4 nuclei risultava incrementata rispetto al controllo ma non statisticamente diversa dal gruppo di IVF direttamente su monostrato BOEC.

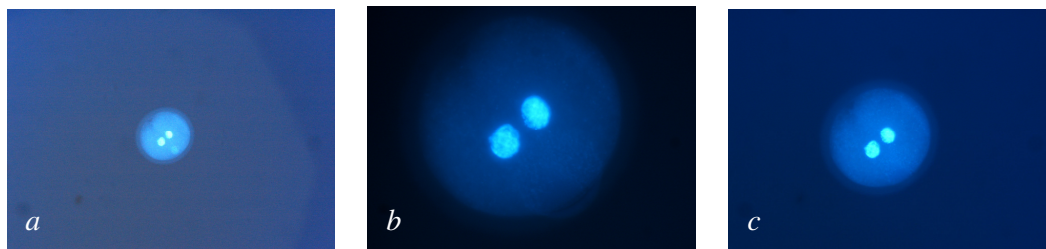


Figura 11 (a,b e c). Embrioni a 2 cellule visualizzati mediante fluorescenza

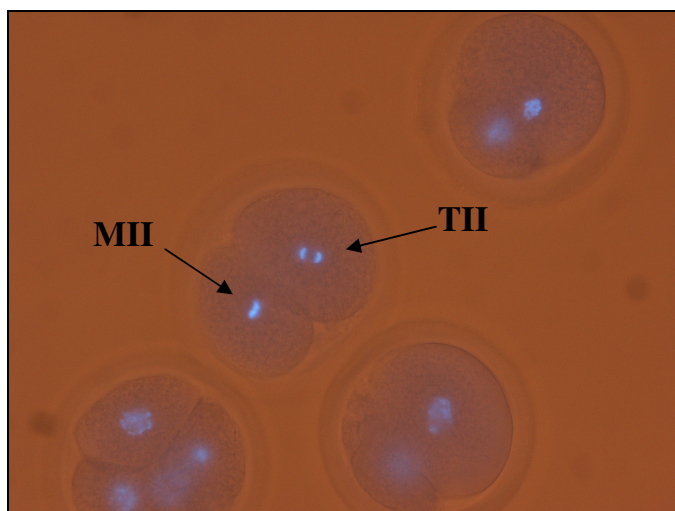
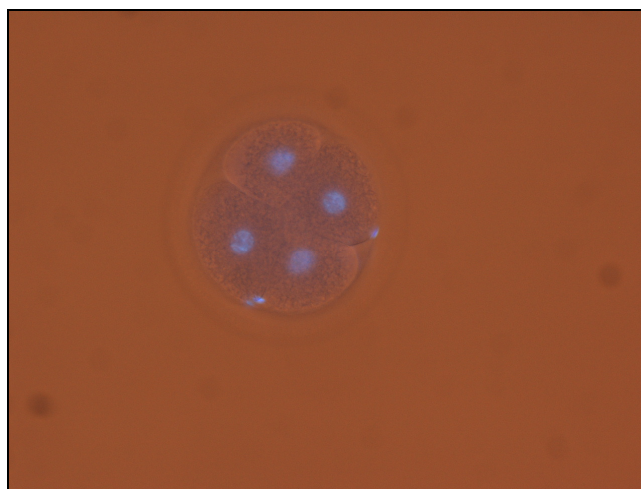


Figura 12. Gruppo di embrioni a 2 e a 4 cellule, visualizzato mediante contrasto interferenziale e fluorescenza. Al centro, embrione a 2 cellule con nuclei in metafase in un blastomero (MII) e in telofase (TII) nell'altro

Figura 13. Embrione a 4 cellule con 4 nuclei in interfase, visualizzato mediante contrasto interferenziale e fluorescenza



Discussione

I risultati di questo esperimento hanno confermato la grande importanza che l'ambiente tubarico riveste durante la fase di IVF.

Infatti, i risultati dell'Esperimento 3 hanno dimostrato che l'incubazione degli spermatozoi di bufalo con le cellule oviduttali in coltura per 3 ore ne promuove la capacitazione in vitro, come indicato dall'incremento delle percentuali di spermatozoi andati incontro a RA dopo induzione con calcio ionoforo. Inoltre, si è osservato allo stesso tempo un effetto positivo delle BOEC sulla motilità spermatica.

Un aspetto interessante da sottolineare è che già a 3 ore si è osservata una riduzione della vitalità spermatica nei diversi gruppi. Tale fenomeno è risultato più accentuato dopo 6 ore di incubazione, con percentuali di cellule vive molto ridotte nel gruppo incubato con eparina (31.5 %) e in quello BOEC in presenza di eparina (29.1%), mentre la vitalità è risultata preservata sulle BOEC in assenza di eparina (67.6%). E' stato, quindi, riscontrato un effetto positivo delle BOEC sul mantenimento della vitalità ma solo quando il medium di sostegno era privo di eparina. La minore vitalità riscontrata in entrambi i gruppi in cui era presente eparina ci risulta di difficile interpretazione, in quanto, allo stato attuale delle conoscenze, non ci sono evidenze che l'eparina possa influenzare negativamente la vitalità delle cellule spermatiche.

Una riduzione della vitalità spermatica in funzione del tempo era stata precedentemente descritta in un altro studio effettuato nel bufalo in cui era stato osservato un netto incremento di spermatozoi morti dopo l'incubazione del seme per 5 ore in presenza di eparina e di calcio ionoforo (Kitiyanant et al.,

2002). Al contrario, nel bovino era stato dimostrato che le cellule epiteliali oviduttali hanno la capacità di mantenere la capacità fecondante e la motilità degli spermatozoi per tempi molto più lunghi (24-30 h) di quelli da noi considerati in questo studio (Pollard et al., 1991). Ne consegue che gli spermatozoi di bufalo sono più vulnerabili ed hanno una vita più breve in vitro rispetto a quelli di bovino.

Ciò spiegherebbe perché, come osservato nella fecondazione, l'efficienza dell'IVF è migliorata nel gruppo BOEC in assenza di pretrattamento del seme ma non nel gruppo BOEC con seme pre-trattato. E' vero che il pre-trattamento del seme con le BOEC o, comunque, con l'eparina esercita un effetto capacitante ma la ridotta vitalità che si osserva dopo le 6 ore suggerirebbe di ridurre, o quantomeno, dimezzare la durata del trattamento in maniera tale da capacitare il seme senza, però, ridurre la percentuale di spermatozoi vivi.

E' verosimile ipotizzare che i tempi di espletamento del processo di capacitazione siano stati ridotti e che, per questo, il gruppo che ha dato i migliori risultati di IVF è stato quello in cui le BOEC erano presenti ma il seme non veniva pre-trattato. D'altra parte, è risaputo che la capacitazione conferisce allo spermatozoo la capacità fecondante ma, al contempo, ne riduce la durata di vita (Hunter, 1987; Smith and Yanagimachi, 1989)

E' possibile affermare, quindi, che le BOEC esercitano un effetto positivo sul processo di fecondazione. Inoltre, osservando i risultati della fecondazione eterologa notiamo che i tassi di penetrazione spermatica sono più elevati nel gruppo sperimentale in cui la IVF è stata eseguita sul monostrato di BOEC, rispetto al gruppo controllo in cui il supporto somatico era assente (79 vs 65%;

$P < 0.05$), mentre i gruppi con seme pre-incubato per 6 ore in medium IVF o in presenza delle BOEC hanno, invece, mostrato risultati intermedi rispetto ai gruppi precedenti e simili tra loro (69 e 70% rispettivamente).

Il trattamento di pre-incubazione del seme con le BOEC per 6 ore era stato previsto sulla base di esperienze precedenti che avevano dimostrato un effetto del liquido tubarico sul processo di capacitazione in vitro nel bovino (Parrish et al., 1989; McNutt et al., 1991), che aumentava, appunto, tra le 4 e le 6 ore di esposizione. E' noto, d'altra parte, che nel bovino, il processo di capacitazione in vitro si svolge nell'arco di 4-5 ore (Xu and Greve, 1988; Florman and First, 1989). Si era, pertanto, ipotizzato che il seme, posto a contatto con le BOEC per 6 ore, sarebbe andato incontro a capacitazione e, conseguentemente, gli spermatozoi avrebbero incontrato gli oociti già in uno stato capacitato. Inseminando gli oociti con spermatozoi già capacitati, il vantaggio ipotizzato era quello di ridurre i tempi di penetrazione, evitando così il rischio del cosiddetto "invecchiamento" della cellula uovo. Gli oociti di bufalo, infatti, che sono particolarmente sensibili a questo fenomeno, come indicato dal miglioramento dell'efficienza IVEP ottenuto anticipando il momento dell'inseminazione in vitro (18-21 ore) e da palesi aspetti di deterioramento qualitativo degli oociti che si osservano già a partire alla ventiquattresima ora post-IVM, superata la quale, sia il tasso di fecondazione, sia le rese embrionali, risultano compromesse (Gasparrini et al., 2008). Un altro aspetto che va tenuto in considerazione è che la cinetica di penetrazione spermatica varia nelle diverse specie e che, in generale, nel bufalo la durata ottimale di co-incubazione dei gameti è stata stimata intorno alle 16 ore, sulle basi della velocità di penetrazione (Gasparrini et al., 2008). Questo ultimo parametro varia anche in funzione del toro, come precedentemente dimostrato (Di Fenza, 2008), ma indipendentemente dal toro,

la penetrazione spermatica in questa specie richiede in media un tempo piuttosto lungo e senz'altro maggiore rispetto alla specie bovina (Ward et al., 2002).

Questi due aspetti peculiari della specie, cioè il precoce invecchiamento in vitro degli oociti ed il maggior tempo necessario perché si compia la penetrazione spermatica, potrebbero essere all'origine della minore efficienza di fecondazione riscontrata.

Tuttavia, la strategia da noi messa in atto per anticipare l'acquisizione della capacità fecondante degli spermatozoi, mediante pre-incubazione su BOEC per 6 ore, non ha determinato miglioramenti quantitativi né del cleavage né della penetrazione spermatica. Un dato interessante che, però, è emerso nel corso di questo esperimento è che in entrambi i gruppi con seme pre-incubato sono state trovate percentuali più elevate di embrioni a stadio avanzato di sviluppo (> di 4 cellule) rispetto al controllo. Questo risultato è in accordo con quanto ipotizzato precedentemente: è verosimile che gli spermatozoi si siano capacitati durante le 6 ore di pre-incubazione e che abbiano quindi anticipato la penetrazione degli oociti. Ad enfatizzare l'importanza di questo dato si riferisce che la cinetica di penetrazione spermatica è correlata al tempo della prima divisione cellulare (cleavage), che, a sua volta, è correlata alle rese embrionali (Ward et al., 2002).

E' opportuno precisare che quando il seme è stato pre-incubato per 6 ore i risultati della IVF eterologa sono stati sovrapponibili, indipendentemente dalla presenza o meno delle BOEC. Si ricorda che il seme pre-incubato in assenza di BOEC era stato semplicemente posto nel medium di IVF 6 ore prima degli oociti. In questo caso l'effetto di capacitazione del seme è imputabile all'eparina

presente nel medium di IVF, la cui azione capacitante è ben nota in varie specie, incluso il bufalo (Boccia L., 2005).

McNutt et al. (1991) hanno confrontato il tasso di fecondazione in gruppi di oociti bovini inseminati con seme pre-incubato con eparina, con fluido follicolare (FF) e con fluido oviduttale (ODF) prelevato nella fase luteinica (L) e non luteinica del ciclo (NL), per 2 e 4 ore. In questo studio, mentre a 2 ore il tasso di fecondazione risultava aumentato con il seme trattato con il 60 % di ODF NL e di FF rispetto all'eparina (34, 44 e 10 % rispettivamente per ODF NL, FF ed eparina), a 4 ore il seme trattato con eparina dava i migliori risultati (41, 51 e 75 % rispettivamente nei tre gruppi).

Nel nostro studio la pre-incubazione del seme in presenza di eparina e di BOEC ha dato un tasso di penetrazione spermatica simile ma il trattamento è stato eseguito solo per la durata di 6 ore; pertanto, non è possibile escludere che a tempi inferiori l'ambiente creato in vitro dalle BOEC potrebbe essere stato competitivo rispetto all'eparina. E' noto, infatti, che l'effetto capacitante dell'eparina è tempo-dipendente, ed incrementa all'aumentare delle ore di incubazione. Questo risultato, d'altra parte, si accorda con quanto riportato da Parrish et al. (1989) che aveva identificato nell'eparina solfato il fattore o, almeno uno dei fattori capacitanti, presenti nell'ODF.

2.1.4 ESPERIMENTO 4: Valutazione degli effetti dell'osteopontina (OPN) sulla capacitazione e sulla fecondazione *in vitro*.

In uno studio condotto nella specie suina, Hao et al (2006) hanno evidenziato un effetto positivo dell'OPN, aggiunta al terreno di IVF, sulla reazione acrosomiale degli spermatozoi e sul processo di fecondazione.

Gongalves et al. (2006) hanno inoltre riportato che, nel bovino, le percentuali di fecondazione si riducono notevolmente quando gli oociti, maturati *in vitro*, e gli spermatozoi vengono pretrattati con anticorpi contro l'OPN.

Nel bovino è stato inoltre osservato un miglioramento della resa embrionale imputabile all'aggiunta di 10µg/ml di OPN nel medium di IVF (Monaco et al., 2009), come pure si è potuto evidenziare un effetto positivo di tale sostanza nell'indurre la capacitazione negli spermatozoi bovini (Monaco et al., 2006).

Si è, pertanto, ritenuto interessante testare l'effetto dell'OPN come agente capacitante (Esperimento 4a) e verificarne l'efficacia durante la IVF (Esperimento 4b) anche nella specie bufalina.

Esperimento 4a : Effetto dell'OPN sulla capacitazione *in vitro*

Disegno sperimentale.

Nell'esperimento si è valutata la capacità dell'OPN di indurre la capacitazione *in vitro* nel seme bufalino a diverse concentrazioni e a diversi tempi sperimentali,

A tale scopo, dopo lo swim-up gli spermatozoi sono stati incubati per 2 e 4 ore in un medium TALP addizionato di ipotaurina (0.1mM), penicillamina (0.2mM) ed albumina (6mg/ml):

- in assenza di agenti capacitanti (controllo)
- in presenza di eparina (0.01mM)
- in presenza di OPN 0.1µg/ml
- in presenza di OPN 1µg/ml
- in presenza di OPN 10µg/ml

Dopo 2 e 4 ore di incubazione, è stata indotta la reazione acrosomiale nei differenti gruppi sperimentali, ed il seme dei diversi gruppi è stato fissato e colorato.

Per la lettura dei vetrini al microscopio (Nikon eclipse 80i) sono stati utilizzati ingrandimenti 20x e 40x.

Gli spermatozoi sono stati valutati allo scongelamento (N = 376), al post swim-up (N = 269) e nei diversi gruppi sperimentali (controllo negativo, eparina, OPN 10µg/ml, 1µg/ml e 0.1µg/ml) a 2 ore (N = 406, 451, 569, 477, e 448, rispettivamente), e a 4 ore (N = 554, 473, 507, 550, e 464, rispettivamente). L'esperimento è stato ripetuto 5 volte.

Materiali e metodi

I reagenti utilizzati sono stati forniti dalla ditta Sigma-Aldrich® (Milano, Italia) e dalla ditta Cook (Limerick, Ireland); il seme testato è stato fornito dal centro tori COFA (Cremona, Italia).

Preparazione della lisofosfatidilcolina (LPC)

E' stata creata una soluzione stock di LPC, miscelando la LPC (L-0906) in metanolo per HPLC, con una concentrazione di 5mg/ml; sono state allestite, quindi, aliquote da 60µl conservate a -20° C fino al momento dell'utilizzo.

Preparazione dell'Osteopontina (OPN)

È stata creata una soluzione stock (50µg/ml) di OPN (O-3514) con un terreno TALP addizionato di ipotaurina (0.1mM), penicillamina (0.2mM) ed albumina (6mg/ml); successivamente sono state operate diluizioni seriali nel TALP a partire da questa soluzione madre per ottenere le tre concentrazioni di OPN desiderate: 10µg/ml, 1µg/ml, 0.1µg/ml. Queste soluzioni sono state poste in incubatore (38.5°C, 5% CO₂/aria).

Preparazione del seme

Gli spermatozoi sono stati ottenuti da seme congelato/scongelato di un toro bufalino precedentemente testato per l'IVF. Al momento dello scongelamento, una quota di spermatozoi è stata fissata e colorata per valutarne la vitalità.

Il seme è stato poi trattato con la procedura dello swim-up per 1 ora, impiegando il buffer COOK (K-SIGB) previamente equilibrato in incubatore (38.5°C, 5% CO₂/aria) al fine di selezionare gli spermatozoi provvisti di motilità progressiva e morfologicamente normali.

Anche in questo caso, subito dopo lo swim-up, una quota di seme è stata fissata e colorata per valutarne la vitalità e l'incidenza della perdita acrosomiale negli spermatozoi non trattati.

Induzione della reazione acrosomiale

La reazione acrosomiale è stata indotta trattando il seme con LPC, noto agente inducente la RA in spermatozoi capacitati senza comprometterne la vitalità. Per l'utilizzo della LPC, al momento dell'uso, il metanolo contenuto nelle aliquote congelate è stato fatto evaporare sotto azoto gassoso, ed è stato, quindi,

aggiunto il terreno TALP addizionato con ipotaurina (0.1mM), penicillamina (0.2mM) ed albumina (6mg/ml) ottenendo una soluzione di LPC da 600 µg/ml.

La reazione acrosomiale è stata, quindi, indotta mediante esposizione degli spermatozoi per 10 minuti a 60 µg/ml LPC. Per fare questo un volume di 112.5 µl di sospensione spermatica di ciascun gruppo sperimentale è stato co-incubato con 12.5 µl della soluzione di LPC 600µg/ml previamente equilibrata (operando una diluizione 1:10) a 38.5°C con il 5% di CO₂.

La percentuale di spermatozoi che presentavano reazione acrosomiale dopo induzione con LPC, calcolata sui vivi, è stata considerata per valutare indirettamente l'avvenuta capacitazione spermatica.

Fissazione e colorazione degli spermatozoi

Il seme è stato fissato e colorato mediante doppia colorazione Trypan blue/Giemsa (Kovács and Foote 1992), come descritto precedentemente.

Analisi statistica

L'analisi dei risultati per evidenziare le differenze fra i gruppi nelle percentuali di spermatozoi con RA è stata effettuata mediante il test del Chi-quadro.

Risultati

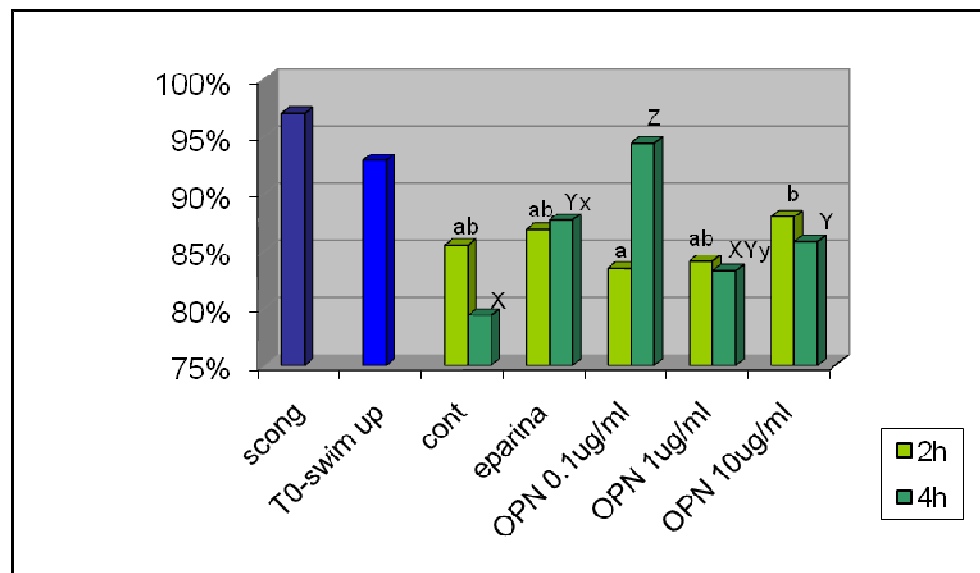
I risultati che attengono la vitalità spermatica nei diversi gruppi sperimentali sono illustrati nella Figura 14. La percentuale di spermatozoi vivi ed integri al momento dello scongelamento è risultata estremamente elevata (97.1%), e ciò sta ad indicare la buona qualità del seme utilizzato nel corso della prova.

Una leggera riduzione (92.9%; $P < 0.05$) di tale parametro è stata registrata dopo la separazione del seme con la metodica dello swim-up. Come era prevedibile,

dopo 2 e 4 ore di incubazione, in tutti i gruppi di trattamento è stata osservata un'ulteriore diminuzione della vitalità spermatica rispetto sia al momento dello scongelamento ($P<0.01$), sia rispetto al post-swim-up ($P<0.05$).

L'unica eccezione è rappresentata dal gruppo trattato per 4 ore con la concentrazione inferiore di OPN (0.1 $\mu\text{g/mL}$), in cui sono stati riportati valori comunque molto elevati (94.4%).

Figura 14. Tasso di vitalità spermatica nei diversi gruppi sperimentali (controllo, eparina e diverse concentrazioni di OPN) a 2 e 4 ore



^{a,b} Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P<0.05$

^{X,Y,Z} Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P<0.01$

^{x,y} Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P<0.05$

E' opportuno sottolineare, però, che, pur essendo diminuita all'aumentare del tempo, la vitalità spermatica è rimasta comunque elevata in tutti i gruppi trattati (79.4-94.4%)

Dopo 2 ore di incubazione la vitalità spermatica si è mantenuta alta (85.5, 86.9, 83.5, 84.1 e 88% per i gruppi controllo, eparina, OPN 0.1, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$,

rispettivamente) e simile nei vari gruppi sperimentali; l'unica differenza che è stato possibile evidenziare consiste nella maggior percentuale di spermatozoi vivi riscontrati dopo il trattamento del seme con OPN alla concentrazione maggiore testata (10 μ g/mL) rispetto alla concentrazione inferiore della stessa proteina (0.1 μ g/mL).

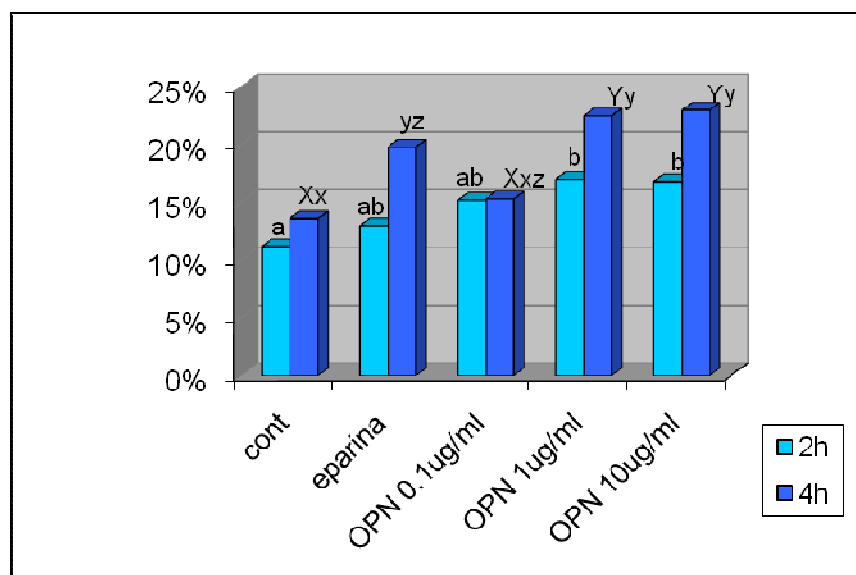
Dopo 4 ore di incubazione nel gruppo controllo, ovvero quello in cui non erano stati aggiunti fattori capacitanti, la vitalità spermatica è stata inferiore (79.4%; $P < 0.01$) sia rispetto al gruppo trattato con eparina (87.7%) sia rispetto ai gruppi trattati con OPN alle concentrazioni 0.1 e 10 μ g/mL (94.4 e 85.8% rispettivamente). Non sono emerse, invece, differenze significative nella vitalità spermatica tra il gruppo trattato con eparina e i gruppi trattati con OPN alle concentrazioni 1 (83.3%) e 10 μ g/mL. Un dato di difficile interpretazione è la maggiore vitalità ($P < 0.01$) riscontrata nel gruppo trattato con 0.1 μ g/mL OPN rispetto a tutti gli altri gruppi e, tra l'altro, contrasta con il dato sulla vitalità registrata nello stesso gruppo a 2 ore.

I risultati più interessanti di questo studio riguardano la capacitazione in vitro del seme (Figura 15) che, come precedentemente esposto, è stata valutata indirettamente considerando la percentuale di spermatozoi andati incontro a RA dopo induzione con lisofosfatidilcolina.

La percentuale di spermatozoi vivi andati incontro alla reazione acrosomiale (RA) è stata molto contenuta sia al momento dello scongelamento (3.3%) sia a quello post-swim-up (4.4%) e sensibilmente ridotta ($P < 0.01$) in questi gruppi rispetto a tutti i gruppi di trattamento. Ciò ha consentito di considerare come

“vera” la reazione acrosomiale osservata dopo il trattamento con sostanze capacitanti e induzione con lisofosfatidilcolina.

Figura 15. Percentuali di reazioni acrosomiali valutate sugli spermatozoi vivi nei diversi gruppi sperimentali (controllo, eparina e diverse concentrazioni di OPN) a 2 e 4 ore



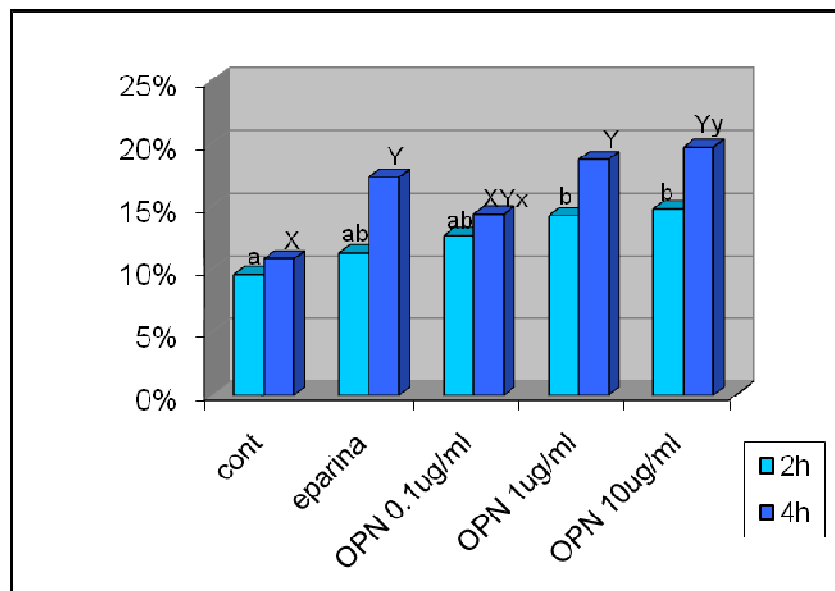
^{a,b} Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0.05$

^{X,Y,Z} Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0.01$

^{x,y} Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0.05$

I risultati ottenuti dopo due ore di trattamento hanno dimostrato che l'OPN alle due concentrazioni maggiori testate (1 e 10 µg/mL) ha un effetto promuovente la capacitazione in vitro del seme di bufalo, come attestato dalle più elevate percentuali di spermatozoi con RA, calcolate sui vivi, registrate rispetto al gruppo controllo (17, 16.8 e 11.2%, rispettivamente; $P < 0.05$). L'esposizione del seme all'eparina ed alla concentrazione inferiore di OPN ha fornito, invece, valori di RA intermedi (13 e 15.2%, rispettivamente). A conferma di quanto detto, si riferisce che quando, allo scopo di elidere la variabile “vitalità” tra i gruppi, le percentuali di RA sono state calcolate sul totale degli spermatozoi, è stato descritto un pattern analogo, come dimostra la Figura 16.

Figura 16. Percentuali di reazioni acrosomiali valutate sugli spermatozoi totali nei diversi gruppi sperimentali (controllo, eparina e diverse concentrazioni di OPN) a 2 e 4 ore



^{a,b} Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0.05$

^{X,Y} Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0.01$

^{x,y} Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0.05$

Dopo 4 ore di incubazione l'OPN alle due concentrazioni maggiori testate (1 e 10 $\mu\text{g/mL}$) determina un ulteriore incremento della capacitazione rispetto al controllo (22.5, 23 e 13.6%, rispettivamente; $P < 0.01$), mentre la concentrazione inferiore (0.1 $\mu\text{g/mL}$) si conferma influente (15.3%). A questo tempo, però, anche il trattamento con l'eparina migliora la capacitazione rispetto al controllo, come indicato dalle più elevate percentuali di spermatozoi con RA (19.8%; $P < 0.05$). Sebbene le differenze rispetto al controllo siano più accentuate quando si utilizza OPN alle concentrazioni 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$, non emergono differenze significative tra questi due gruppi e quello trattato con eparina. Infine la concentrazione 0.1 $\mu\text{g/mL}$ di OPN ha fornito valori intermedi tra il gruppo controllo e l'eparina, e nettamente inferiori ($P < 0.01$) rispetto a quelli registrati con le altre due concentrazioni di OPN. Quest'ultimo risultato si spiega con la

maggior percentuale di spermatozoi vivi osservata nel gruppo trattato con la concentrazione inferiore di OPN al tempo 4 ore. Infatti, se le percentuali di RA vengono calcolate sul totale degli spermatozoi, non si osserva più una netta differenza tra la concentrazione inferiore di OPN e le due maggiori; l'unica differenza ancora evidenziabile ($P < 0.05$) è tra quella inferiore e quella superiore (Figura 16).

Gli altri risultati, invece, non cambiano in maniera sostanziale, pur osservandosi qualche variazione di significatività. In particolare, il trattamento del seme con eparina e con le due concentrazioni maggiori di OPN si traduce in un aumento ($P < 0.01$) delle percentuali di RA rispetto al controllo, mentre alla concentrazione inferiore l'OPN fornisce risultati intermedi.

Esperimento 4b: Effetto dell'aggiunta di OPN durante la IVF.

Sulla base dei risultati ottenuti nella prima parte del lavoro si è ritenuto di estremo interesse testare l'effetto delle stesse concentrazioni di OPN anche sulla fecondazione.

In particolare, si è valutato se l'OPN, aggiunta al medium di IVF, sia in grado di migliorare nella specie bufalina:

- il processo di fecondazione in vitro e, quindi la percentuale di cleavage (divisione cellulare);
- lo sviluppo embrionale, inteso come percentuale di embrioni trasferibili, ovvero di morule compatte (CM) e blastocisti (BL) di qualità superiore (Gradi 1 e 2);
- la qualità degli embrioni prodotti in vitro, utilizzando come parametro di valutazione la cronologia di sviluppo

Disegno sperimentale

Un totale di 1046 COC bufalini sono stati selezionati e maturati *in vitro*. Al momento della fecondazione *in vitro* (giorno 0) gli oociti maturi sono stati suddivisi a random in 4 gruppi sperimentali per valutare l'effetto delle differenti concentrazioni di OPN aggiunte al terreno di fecondazione.

In modo specifico sono state confrontate quattro condizioni di fecondazione differenti:

- Gruppo A: 258 oociti sono stati fecondati in assenza di OPN (controllo)
- Gruppo B: 263 oociti sono stati fecondati in presenza di 0.1 µg/ml di OPN
- Gruppo C: 261 oociti sono stati fecondati in presenza di 1 µg/ml di OPN
- Gruppo D: 264 oociti sono stati fecondati in presenza di 10 µg/ml di OPN

Materiali e metodi

Tutti i reagenti utilizzati sono stati forniti dalla ditta Sigma® (Milano, Italia), se non diversamente specificato.

Recupero degli oociti

Le ovaie di bufala sono state prelevate al macello in soluzione fisiologica antibiotata con 150 mg/L di kanamicina a 30-35 °C e trasportate in laboratorio entro 3-4 ore dall'avvenuta macellazione. Gli oociti sono stati recuperati mediante aspirazione dei follicoli del diametro di 2-8 mm, utilizzando un ago di 18 G connesso ad una pompa di aspirazione, operante a pressione negativa controllata (40-50mm Hg). Si è proceduto, quindi, con la valutazione morfologica degli oociti raccolti e con la selezione in particolare degli elementi classificati come A e B.

Infatti, solo i complessi cumulo-oocita di grado A e B, considerati adatti alla IVEP (Neglia et al, 2003), sono stati utilizzati per la produzione embrionale in vitro (Figura 17).

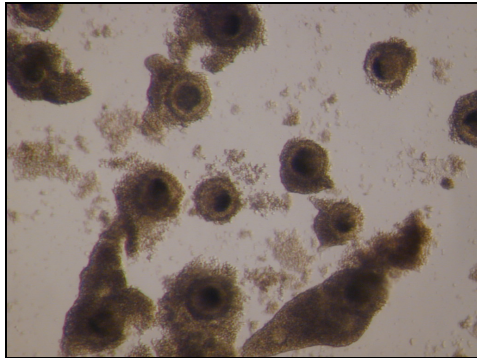


Figura 17. Oociti immaturi di bufalo selezionati per l'IVM

Maturazione in vitro (IVM)

Per la maturazione in vitro degli oociti si è utilizzato un terreno commerciale, il TCM 199 tamponato con 25 mM di bicarbonato di sodio ed addizionato di siero fetale di vitello (FCS) al 10 %, 0.2 mM di piruvato di sodio, 0.5 µg/ml di FSH, 5 µg/ml di LH, 1 µg/ml di 17β-estradiolo, 50 µg/ml di kanamicina, 50 µM di cisteamina (Gasparrini et al., 2000) e 0.3 mM di cistina (Gasparrini, 2006). I COC selezionati (N = 1046, per un totale di 6 repliche), previo abbondante lavaggio in TCM 199, tamponato con 15 mM di Hepes e 5 mM di bicarbonato di sodio (H199) e addizionato del 10 % di FCS, completato da un lavaggio nel terreno finale di maturazione, sono stati posti in gocce di 50 µl (10 COC/goccia) dello stesso medium, coperte di olio minerale. La IVM è stata effettuata alla temperatura di 38.5°C, in atmosfera gassosa controllata con il 5% di CO₂ in aria umidificata.

Fecondazione in vitro (IVF)

Gli spermatozoi da utilizzare per la fecondazione *in vitro* sono stati ottenuti da seme congelato/scongelato di un toro precedentemente testato per la IVF. Il seme è stato trattato mediante la procedura dello swim-up per 1 ora, utilizzando il medium Ham's. Il pellet ottenuto dopo centrifugazione del surnatante è stato risospeso in modo da ottenere una concentrazione finale di 2×10^6 /ml spermatozoi nel terreno di fecondazione. I COCs sono stati lavati due volte in Tyrode Albumine Lactate Pyruvate (Lu et al., 1987) tamponato con 20mM di Hepes e 5mM di Bicarbonato di Sodio (Hepes TALP). L'ultimo lavaggio è stato effettuato in Tyrode Albumine Lactate Pyruvate tamponato con 25 mM di bicarbonato di Sodio (Fert TALP) ed addizionato di 0.2 mM di penicillamina, 0.1 mM di ipotaurina e 0.01 mM di eparina. L'inseminazione è stata effettuata in gocce di 50 μ l (5 oociti/goccia) dello stesso terreno a 38.5°C, in presenza del 5 % di CO₂ in aria per una durata di 20-22 ore.

Coltura in vitro (IVC)

Circa 20 ore dopo la IVF i presunti zigoti sono stati rimossi dal medium di fecondazione, denudati delle cellule del cumulo mediante ripetuto spipettamento, lavati 2 volte in medium SOF Hepes-tamponato e messi in coltura in gocce (10/goccia) di 20 μ l di Synthetic Oviduct Fluid (SOF; Tervit et al., 1972), tamponato con 25 mM di bicarbonato di sodio al quale sono stati aggiunti aminoacidi essenziali e non essenziali e 8 mg/ml di albumina serica bovina (SOFaaBSA). Al giorno 5 di coltura (Giorno 0 = IVF) è stata fatta una valutazione del cleavage e gli oociti degenerati e indivisi sono stati eliminati e gli embrioni sono stati trasferiti in medium fresco per ulteriori due giorni di IVC. La valutazione della resa embrionale, intesa come morule compatte (MC) e

blastocisti (BL), è stata eseguita il giorno 7. In particolare sono state considerate le percentuali di embrioni trasferibili (ET) ottenute dai COC, intendendosi per ET le morule compatte (MC) e le blastocisti (BL) di qualità superiore, ovvero di Grado 1 e 2, secondo la classificazione ufficialmente riconosciuta dal manuale dell'International Embryo Transfer Society.

Poiché è noto che la cronologia di sviluppo è uno dei parametri più affidabili per valutare la qualità e, quindi, la vitalità degli embrioni, sono state anche registrate le percentuali di embrioni negli stadi più avanzati di sviluppo, ovvero le blastocisti sgusciate (HBL) e le blastocisti espanse (XBL), sia in relazione ai COC totali utilizzati, sia rispetto al totale degli embrioni trasferibili prodotti.

Analisi statistica

Le differenze tra i gruppi considerati nelle percentuali di cleavage e di embrioni trasferibili, così come le percentuali di embrioni più precoci sul totale degli oociti e degli embrioni prodotti, sono state analizzate mediante il test Chi-quadro.

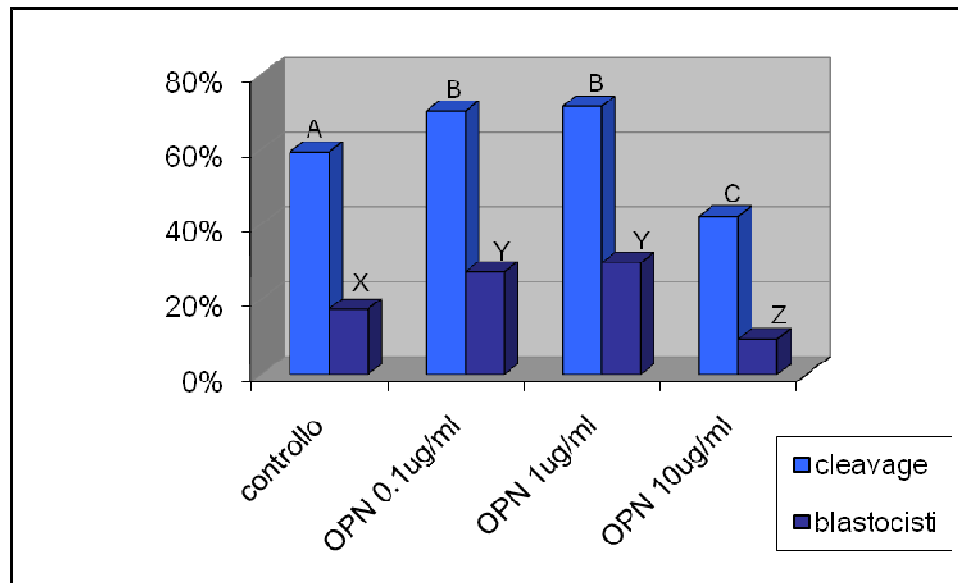
Risultati

L'analisi dei dati ha evidenziato che l'aggiunta di OPN al medium di IVF esercita un'influenza positiva sia sull'efficienza di fecondazione degli oociti di bufalo, indicata dalle incrementate percentuali di cleavage, sia sullo sviluppo embrionale successivo, come si evince dalle più elevate percentuali di embrioni trasferibili in toto (CM + BL) e delle sole BL (Figura 18).

In particolare, l'effetto benefico è stato osservato utilizzando le due concentrazioni inferiori di OPN (0.1µg/ml e 1µg/ml) che hanno dato risultati migliori (cleavage: 70.3 e 70.1%; CM+BL: 27.4 e 29.9%; BL: 23.2 e 22.2% rispettivamente; $P < 0.01$) sia rispetto al gruppo di controllo (cleavage: 59.3%;

CM+BL: 17.4%; BL: 13.2%) che alla concentrazione di 10µg/ml, che era la più elevata testata in questo studio (cleavage: 42.4%; CM+BL: 9.5%; BL: 6.8%). Vale la pena sottolineare che alla concentrazione maggiore da noi impiegata è stato riportato un decremento significativo ($P<0.01$) sia della percentuale di cleavage che delle rese embrionali rispetto al gruppo di controllo, suggerendo che a questa concentrazione non solo l'effetto promuovente scompare ma la proteina esercita piuttosto un effetto inibente.

Figura 18. Effetto dell'OPN su cleavage e resa embrionale (%)



A,B,C Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P<0.01$
 X,Y,Z Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P<0.01$

Un fenomeno interessante è, inoltre, emerso dal confronto tra i gruppi delle percentuali di embrioni che, a parità di tempo di coltura (7 giorni), hanno raggiunto i più avanzati stadi di sviluppo (HBL e XBL). Quando le percentuali di embrioni più precoci sono state calcolate sul totale dei COC, è stato riscontrato che nel gruppo trattato con OPN alla concentrazione inferiore, ovvero a quella

di 0.1µg/ml i valori sono risultati più elevati (17.5%; $P<0.01$), sia rispetto al gruppo controllo (6.2%) che al gruppo con la concentrazione maggiore di 10µg/ml (4.5%), mentre non sono emerse differenze significative con il gruppo a concentrazione intermedia, ovvero di 1µg/ml (11.9%).

Infine un incremento significativo della percentuale di embrioni più avanzati sul totale degli embrioni trasferibili prodotti è stato riportato nel gruppo trattato con OPN alla concentrazione inferiore, ovvero a quella di 0.1µg/ml rispetto a tutti gli altri gruppi (32.0, 59.8, 39.2 e 42.9% rispettivamente nel controllo e nei gruppi trattati con 0.1µg/ml, 1µg/ml e 10µg/ml di OPN; $P<0.01$).

I risultati del presente studio hanno dimostrato che l'OPN, aggiunta durante la IVF alle concentrazioni di 0.1 e 1µg/ml esplica una influenza positiva sul processo di fecondazione, come indicato dalle più elevate percentuali di cleavage riportate, e sullo sviluppo embrionale *in vitro*, come attestato dalle maggiori percentuali sia di embrioni trasferibili in toto (CM + BI) sia delle sole BL di qualità superiore. Questo effetto promuovente lo sviluppo embrionale, però, scompare già alla concentrazione di 10µg/ml, alla quale si osserva un decremento significativo rispetto al controllo delle percentuali di cleavage e delle rese embrionali, ad indicare probabilmente l'inizio di un effetto tossico.

Discussione degli Esperimenti 4a e 5b

I risultati di questi esperimenti ancora una volta evidenziano l'importanza di conoscere la composizione dell'ODF al fine di migliorare l'efficienza *in vitro* della fase di fecondazione.

L'OPN è, come precedentemente riportato, una proteina presente nell'ODF. Nel bovino, l'OPN è stata considerata un valido marker di fertilità maschile, in quanto tori ad alta fertilità mostrano una maggiore espressione di tale proteina nel liquido seminale; inoltre, dato ancora più interessante, è che il trattamento di spermatozoi di tori ipofertili con il secreto delle ghiandole accessorie di tori fertili ne migliora la capacità fecondante. E' verosimile, dunque, che nel secreto delle ghiandole accessorie dei tori a buona capacità fecondante ci sia una maggiore concentrazione di OPN che ne potenzia la fertilità.

Sappiamo che gli spermatozoi acquisiscono la capacità fecondante mediante il processo di capacitazione, che in natura si svolge lungo le vie genitali femminili, dove questa proteina è presente. Nel sistema di IVF il passaggio nell'apparato riproduttivo femminile viene a mancare, e la capacitazione spermatica deve essere indotta in vitro; inoltre per la IVF si utilizza seme congelato/scongelato, in cui la concentrazione di OPN si riduce notevolmente rispetto al fresco (Pero M.E. et al 2007).

Una prima interessante osservazione che nasce dai risultati dell'Esperimento 4a riguarda la vitalità spermatica che si è mantenuta elevata in tutti i gruppi nel corso delle quattro ore di durata dell'esperimento, anche se nel gruppo di controllo negativo, ovvero in quello in cui il seme era stato incubato nel terreno di fecondazione in assenza di fattori capacitanti, è stata riscontrata una vitalità leggermente minore dopo 4 ore di incubazione.

I risultati più importanti, però, riguardano l'aver dimostrato un effetto dell'OPN sull'induzione della capacitazione in vitro degli spermatozoi di bufalo. In particolare è stato osservato che già dopo 2 ore di incubazione l'OPN, alle due maggiori concentrazioni testate, incrementa in maniera significativa ($P < 0.05$) la

percentuale di spermatozoi andati incontro a reazione acrosomiale rispetto al gruppo di controllo negativo, mentre l'eparina e la concentrazione inferiore di OPN fanno registrare valori intermedi.

A questo tempo di incubazione, l'eparina sembra essere addirittura inefficace nell'indurre la capacitazione del seme, come indicato dalle percentuali di spermatozoi con RA simili a quelle riscontrate nel controllo negativo. In realtà, osservando i risultati nel loro insieme, non è possibile affermare che l'eparina sia risultata inefficace in assoluto, quanto piuttosto che per espletare un effetto capacitante abbia richiesto un tempo di incubazione maggiore. Infatti dopo 4 ore di trattamento l'eparina determina un incremento significativo ($P < 0.05$) della capacitazione rispetto al controllo negativo che non è diverso statisticamente da quello registrato con l'OPN alle concentrazioni 1 e 10 $\mu\text{g/ml}$.

Tuttavia la differenza rispetto al controllo negativo è più marcata ($P < 0.01$) quando il seme viene incubato con 1 e 10 $\mu\text{g/ml}$ di OPN. Nell'ambito del range di concentrazioni di OPN da noi testato appare evidente che la concentrazione inferiore, ovvero quella di 0.1 $\mu\text{g/ml}$, è inefficace nell'indurre la capacitazione mentre le concentrazioni 1 e 10 $\mu\text{g/ml}$ di OPN hanno pari efficacia.

Sebbene non sia emersa una differenza statisticamente significativa tra il gruppo controllo positivo e le due concentrazioni efficaci di OPN, ad entrambi i tempi considerati, questi risultati nell'insieme lasciano propendere per una superiorità dell'OPN rispetto alla stessa eparina.

E' noto che il processo della capacitazione spermatica, così come quello della RA sono dipendenti dall'incremento del Ca^{++} intracellulare. Poiché l'osteopontina influenza la concentrazione intracellulare di Ca^{++} (Denhardt D.T. et al., 1993) è possibile ipotizzare che l'effetto promuovente la capacitazione sia

appunto mediato dalla sua capacità di influenzare le oscillazioni di questo ione. Come già menzionato, perché i processi di capacitazione prima e di RA poi possano svolgersi è necessaria la presenza di Ca^{++} nell'ambiente extracellulare. Durante questi processi si osserva un innalzamento dei livelli intracellulari di Ca^{++} che infine determina l'esocitosi dei granuli corticali e la fusione dei due gameti. E' stato dimostrato che i recettori di diverse integrine possono innescare l'incremento del Ca^{++} intracellulare (Jaconi M.E. et al., 1991; Schwartz M.A., 1993). Uno studio interessante ha riportato un incremento transitorio del Ca^{++} intracellulare in osteoclasti di ratto perfusi con OPN e con altri ligandi delle integrine (Zimolo et al., 1994). Questo innalzamento del Ca^{++} intracellulare derivava dalle riserve endogene ma avveniva solo in presenza del Ca^{++} extracellulare.

Comunque il meccanismo mediante il quale l'OPN innesca l'aumento del Ca^{++} intracellulare non è conosciuto. L'eparina è il fattore utilizzato di routine per la capacitazione in vitro degli spermatozoi. Nel bovino la capacitazione indotta da eparina è mediata dal legame della stessa alla membrana spermatica (Parrish et al., 1988), con conseguente ingresso di Ca^{++} ed aumento della concentrazione intracellulare del Ca^{++} libero (Handrow et al., 1989). Si potrebbe ipotizzare che l'interazione dell'eparina con la membrana spermatica sia mediata dall'OPN, in quanto l'OPN contiene un sito di legame per il Ca^{++} e due domini di legame per l'eparina.

In uno studio recente è stato evidenziato che la fosforilazione di molte proteine spermatiche è importante per la capacitazione indotta da eparina nel bovino (Galantino-Homer H.L. et al., 1997). Vale la pena ricordare che la presenza dell'OPN è stata dimostrata a livello della membrana spermatica bovina (Souza

et al., 2008) e che questa proteina va incontro ad una serie di modificazioni post-traduzionali, che includono la fosforilazione (Johnson G.A. et al., 2003).

Alla luce di quanto detto possiamo ipotizzare che l'OPN presente sulla membrana spermatica al momento dell'eiaculazione si leghi all'eparina attraverso i domini leganti eparina che possiede, e che questo complesso OPN-eparina inneschi l'innalzamento del Ca^{++} intracellulare e di conseguenza, la capacitazione. Ne consegue che sarebbe interessante testare gli effetti combinati di OPN ed eparina sulla capacitazione in vitro, dato che in vivo l'OPN presente sullo spermatozoo eiaculato è integrata, durante la fecondazione, da quella presente nel liquido tubarico mentre in vitro tale proteina è assente o, comunque, presente in scarsa concentrazione.

Quando l'OPN è stata aggiunta durante l'IVF (Esperimento 4b), i risultati hanno dimostrato che questa esplica una influenza positiva sul processo di fecondazione e sullo sviluppo embrionale *in vitro*. A differenza dei risultati ottenuti nell'Esperimento 4a sulla capacitazione, tuttavia, è interessante notare che in fecondazione si sono dimostrate migliori le concentrazioni inferiori (0.1 e 1 $\mu\text{g/ml}$), in termini di percentuali di cleavage, di embrioni trasferibili in toto (CM + BI) e delle sole BL di qualità superiore. L'effetto promuovente lo sviluppo embrionale, infatti, scompare alla concentrazione di 10 $\mu\text{g/ml}$, alla quale si osserva un decremento significativo rispetto al controllo delle percentuali di cleavage e delle rese embrionali, ad indicare probabilmente l'inizio di un effetto tossico.

I risultati ottenuti nel corso di questo lavoro nel bufalo sono in qualche modo comparabili ad esperienze precedenti condotte nel bovino e nel maiale in cui

pure si sono evidenziati degli effetti positivi incorporando l'OPN nei media di IVF anche se è opportuno evidenziare alcune differenze tra le specie.

Al miglioramento del cleavage descritto nel nostro studio fa riscontro un effetto positivo sulla reazione acrosomiale, la riduzione della polispermia e l'incrementata efficienza della fecondazione monospermica descritti nel suino (Hao et al., 2006) utilizzando durante la IVF esattamente le stesse concentrazioni di OPN.

In un recente studio eseguito nella specie bovina è stato dimostrato un ruolo dell'OPN nel processo di capacitazione spermatica in vitro (Monaco et al., 2008). Ciononostante, quando la OPN è stata introdotta nel sistema di fecondazione in vitro bovino il cleavage non è stato influenzato mentre l'effetto positivo è stato osservato sullo sviluppo embrionale successivo; in questo studio la concentrazione ottimale nel bovino è stata dieci volte maggiore rispetto a quella utilizzata nel suino e nel bufalo. Queste differenze di risposta alle concentrazioni possono essere imputabili sia a differenze specie-specifiche sia all'origine della proteina utilizzata; quest'ultima è stata infatti diversa nei tre studi.

Nel nostro lavoro si è utilizzata osteopontina bovina altamente purificata di derivazione bovina, commercializzata dalla Sigma® (O3514-50UG), nel maiale è stata impiegata osteopontina ricombinante di ratto, mentre nel bovino la proteina era stata derivata da latte bovino scremato. E' verosimile che l'origine stessa di quest'ultima e, quindi la sua minore purezza, sia alla base della maggiore concentrazione richiesta per ottenere un effetto.

Un'altra differenza emersa tra le specie studiate riguarda la mancata evidenziazione di un effetto positivo sul cleavage nella specie bovina a

differenza delle altre due. In realtà ciò potrebbe anche essere spiegato con il fatto che sia nel bufalo e ancor più nel maiale l'efficienza della fecondazione in vitro è piuttosto bassa mentre nel bovino le percentuali di cleavage sono generalmente alte; ne consegue che è più difficile evidenziare un effetto migliorativo quando il valore di controllo è già a livelli molto alti. Comunque alla luce dei risultati emersi nel corso dell'Esperimento 4a, è possibile ipotizzare che l'incremento del cleavage possa essere ascrivibile al miglioramento della capacità fecondante degli spermatozoi.

Nel nostro studio un dato particolarmente importante è scaturito dall'analisi dei dati riferibili agli embrioni che avevano raggiunto uno stadio più avanzato di sviluppo al termine della coltura in vitro. E' stato osservato, infatti che, oltre all'incremento in percentuale degli embrioni prodotti, l'OPN utilizzata alla concentrazione inferiore ha determinato un miglioramento qualitativo delle rese embrionali.

E' noto che uno dei parametri più accreditati per prevedere la vitalità embrionale è la cronologia di sviluppo: gli embrioni più precoci sono anche i più vitali. Nel gruppo trattato con 0.1µg/ml di OPN le percentuali di embrioni in uno stadio avanzato di sviluppo, calcolate sui COC, sono state più elevate rispetto al gruppo non trattato (controllo) e a quello trattato con la concentrazione maggiore (10µg/ml). Inoltre, nello stesso gruppo ben il 60% degli embrioni trasferibili prodotti aveva raggiunto stadi avanzati di sviluppo, quali quello di blastocisti sgusciata (HBL) ed espansa (XBL).

Queste osservazioni deporrebbero a favore di un miglioramento qualitativo degli embrioni che si identifica nella migliore vitalità degli stessi. L'importanza di questo risultato è data dal fatto che la vitalità dell'embrione è il primo fattore che

ne condiziona la sopravvivenza alla crioconservazione così come l'attecchimento e lo sviluppo a termine dopo trasferimento embrionale in animali riceventi.

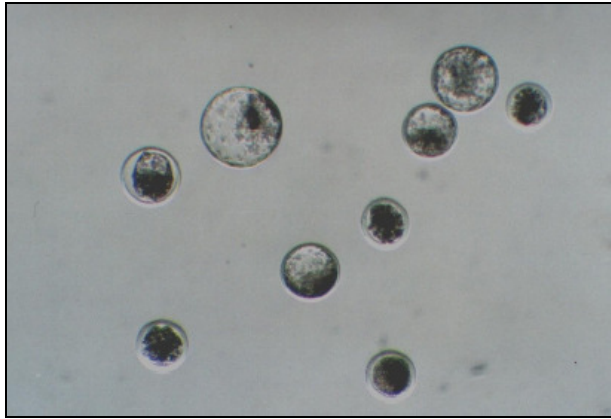


Figura 19. Gruppo di blastocisti di bufalo prodotte in vitro

2.1.5 ESPERIMENTO 5: Effetto della plasmina sulla reazione acrosomiale nel bufalo.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare il ruolo della plasmina sulla fecondazione *in vitro* nel bufalo (*Bubalus bubalis*) verificando se tale enzima proteolitico, fosse capace di indurre la reazione acrosomiale *in vitro* in spermatozoi bufalini capacitati con eparina. L'efficacia della plasmina è stata poi confrontata con quella della lisofosfatidilcolina (LPC), utilizzata come controllo positivo.

Ulteriore obiettivo di questo studio è stato quello di valutare la motilità degli spermatozoi bufalini, dopo esposizione a plasmina.

In base ad esperienze precedenti realizzate nella specie suina (Sa et al., 2006), si è scelto il range di concentrazioni di plasmina da impiegare nell'esperimento (1µg/ml, 0.1µg/ml, 0.01µg/ml, 0.001µg/ml). Si sono inoltre considerati diversi tempi post-incubazione (0, 2 e 4 ore).

A ciascun tempo sono state quindi stimate l'efficacia della plasmina nell'indurre la reazione acrosomiale e i suoi effetti sulla motilità spermatica nei diversi gruppi sperimentali.

Disegno sperimentale

L'esperimento è stato realizzato su spermatozoi di un toro precedentemente testato per l'IVF.

Gli spermatozoi sono stati separati mediante swim-up e successivamente incubati in TALP, in presenza di eparina (0.01mM), ipotaurina (0.1mM), penicillamina (0.2mM) ed albumina (6mg/ml) per 0, 2 e 4 ore.

Dopo 0, 2 e 4 ore di incubazione è stata indotta la reazione acrosomiale nei differenti gruppi sperimentali: gli spermatozoi sono stati esposti per 10 minuti a 60 µg/ml di LPC oppure a 1µg/ml, 0.1µg/ml, 0.01µg/ml, 0.001µg/ml di plasmina rispettivamente, alle medesime condizioni di atmosfera gassosa controllata a 38.5°C.

Inoltre, come controllo, a ciascun tempo una quota di spermatozoi è stata fissata e colorata senza alcuna induzione della reazione acrosomiale.

Gli spermatozoi sono stati valutati: allo scongelamento (N = 217), al post swim-up (N = 243) e nei diversi gruppi sperimentali (eparina, LPC, plasmina 1µg/ml, 0.1µg/ml, 0.01µg/ml e 0.001µg/ml) al tempo 0 (N = 407, 408, 314, 427, 367 e 411 rispettivamente), a 2 ore (N = 415, 441, 450, 425, 434, e 441,

rispettivamente) ed, infine, a 4 ore (N = 447, 444, 428, 453, 437 e 448, rispettivamente). L'esperimento è stato ripetuto 4 volte.

Materiali e metodi

I reagenti utilizzati sono stati forniti dalla ditta Sigma-Aldrich® (Milano, Italia) e dalla ditta Cook (Limerick, Ireland); il seme testato è stato fornito dal centro tori COFA (Cremona, Italia).

Preparazione della LPC

E' stata creata una soluzione stock di LPC (L-0906), derivante da semi di soia, miscelando la LPC in metanolo per HPLC, con una concentrazione di 5mg/ml; sono state allestite aliquote da 60µl e sono state stoccate a -20°C.

Preparazione della plasmina

È stata creata una soluzione stock di Plasmina (P-1867) miscelando la plasmina in acqua per embrioni (W-1503) in ragione di 150µg/ml; successivamente sono state operate diluizioni seriali nel terreno TALP a partire da questa soluzione madre per ottenere 4 concentrazioni base: 10µg/ml, 1µg/ml, 0.1µg/ml, 0.01µg/ml.

Queste soluzioni sono state poste in incubatore (38.5°C, 5% CO₂/aria) per almeno 2 ore prima dell'uso.

Il medium TALP è stato addizionato con eparina (0.01mM) come fattore capacitante, ipotaurina (0.1mM) e penicillamina (0.2mM) per mantenere la motilità spermatica, ed albumina (6mg/ml)

Preparazione del seme

Seme congelato/scongelato di quattro tori bufalini di razza Mediterranea Italiana è stato mescolato al fine di annullare l'effetto toro. Questo mix è stato poi trattato con la procedura dello swim-up per 1 ora, al fine di selezionare gli spermatozoi provvisti di motilità progressiva e morfologicamente normali.

Subito dopo la separazione tramite swim-up, una quota di spermatozoi da ciascun campione è stata fissata e colorata per valutare l'incidenza della perdita acrosomiale nelle cellule non trattate (tempo 0).

Induzione della reazione acrosomiale

Per l'utilizzo della LPC, al momento dell'uso, il metanolo contenuto nelle aliquote congelate è stato fatto evaporare sotto azoto gassoso, ed è stato, quindi, aggiunto il terreno TALP addizionato con ipotaurina (0.1mM), penicillamina (0.2mM), eparina (0.01mM) ed albumina (6mg/ml) ottenendo una soluzione di LPC da 600 µg/ml. La reazione acrosomiale è stata, quindi, indotta mediante esposizione degli spermatozoi per 10 minuti a 60µg/ml LPC. Per fare questo un volume di 112.5µl di sospensione spermatica di ciascun gruppo sperimentale è stato co-incubato con 12.5µl della soluzione di LPC 600µg/ml previamente equilibrata (operando una diluizione 1:10) a 38.5°C con il 5% di CO₂.

Per l'induzione della reazione acrosomiale con la plasmina, al momento dell'uso, le soluzioni equilibrate in incubatore sono state diluite 1:10 con il seme, al fine di ottenere le concentrazioni desiderate (1µg/ml, 0.1µg/ml, 0.01µg/ml, 0.001µg/ml).

Fissazione e colorazione degli spermatozoi

Il seme è stato fissato e colorato mediante doppia colorazione Trypan blue/Giemsa (Kovács and Foote 1992), come descritto nell'Esperimento 1.

Analisi statistica

L'analisi dei risultati per evidenziare le differenze fra i gruppi nelle percentuali di spermatozoi con RA è stata effettuata mediante il test del Chi-quadro.

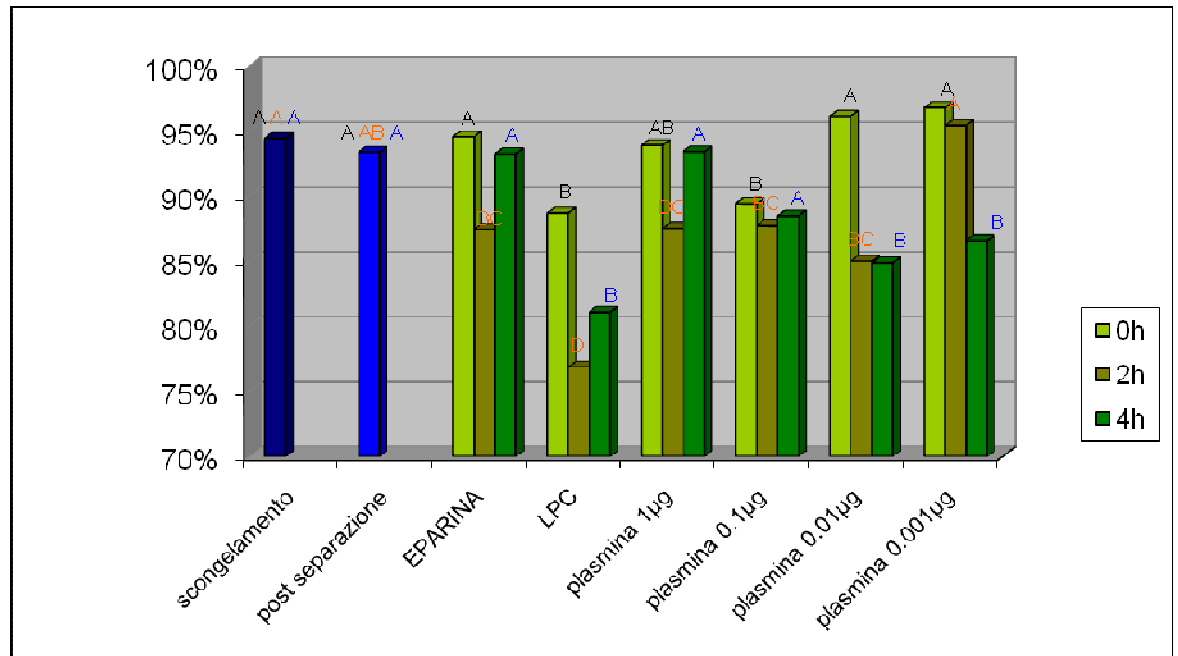
Risultati

Un primo dato importante emerso nel corso dello studio è che la vitalità spermatica al tempo 0 era elevata in tutti i gruppi sperimentali (88.7-96.8%) e si è mantenuta tale anche a 2 ore (76.9-95.5%) e a 4 ore (81.1-93.5%) post-incubazione.

Questo dato indica che la qualità del seme congelato/scongelato utilizzato nella prova era ottima. Tuttavia, è stato possibile evidenziare alcune differenze nella vitalità spermatica entro i gruppi, che sono illustrate nella Figura 20.

Al tempo 0 il trattamento del seme con la plasmina alle concentrazioni 1, 0.01 e 0.001 µg/ml non ha determinato alcuna riduzione di questo parametro rispetto alle condizioni di partenza, cioè al momento dello scongelamento ed al momento immediatamente successivo alla separazione con lo swim-up (93.9, 96.2, 96.8, 94.5 e 93.4%, rispettivamente).

Figura 20. Vitalità spermatica (%) nei diversi gruppi sperimentali (eparina, LPC e diverse concentrazioni di plasmina) a 0, 2 e 4 ore



A,B,C,D Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0.01$

Al contrario, è stata osservata una minore vitalità ($P < 0.01$) dopo il trattamento con LPC (88.7%) e con plasmina alla concentrazione 0.1µg/ml (89.5%).

Analogamente, dal confronto tra i gruppi trattati è emerso che una riduzione della vitalità spermatica si osserva nei gruppi trattati con LPC e con plasmina alla concentrazione di 0.1µg/ml, mentre sono stati riscontrati valori intermedi nel gruppo esposto alla concentrazione di plasmina maggiore (1µg/ml).

Come atteso, la vitalità spermatica a 2 ore è risultata diminuita ($P < 0.01$) rispetto allo scongelamento in tutti i gruppi trattati, ad eccezione del gruppo esposto alla minore concentrazione di plasmina, i.e. 0.001µg/ml (87.5, 76.9, 87.6, 87.8, 85 e 95.5% per i gruppi eparina, LPC, plasmina 1µg/ml, 0.1µg/ml, 0.01µg/ml e 0.001µg/ml, rispettivamente).

Tuttavia, considerando il momento in cui si è conclusa la separazione del seme con la divisione nei diversi gruppi come punto di partenza dell'esperimento, osserviamo che rispetto al post-swim-up solo il gruppo trattato con LPC ha mostrato una minore ($P < 0.01$) vitalità a 2 ore.

Ne consegue che i diversi trattamenti con plasmina non hanno influito negativamente sulla vitalità spermatica mentre una diminuzione significativa di tale parametro è stata riscontrata dopo esposizione a LPC. Dal confronto tra i gruppi trattati emerge che la maggiore vitalità è stata riscontrata nel gruppo plasmina 0.001 μ g/ml e la minore nel gruppo LPC, con valori intermedi alle altre concentrazioni di plasmina.

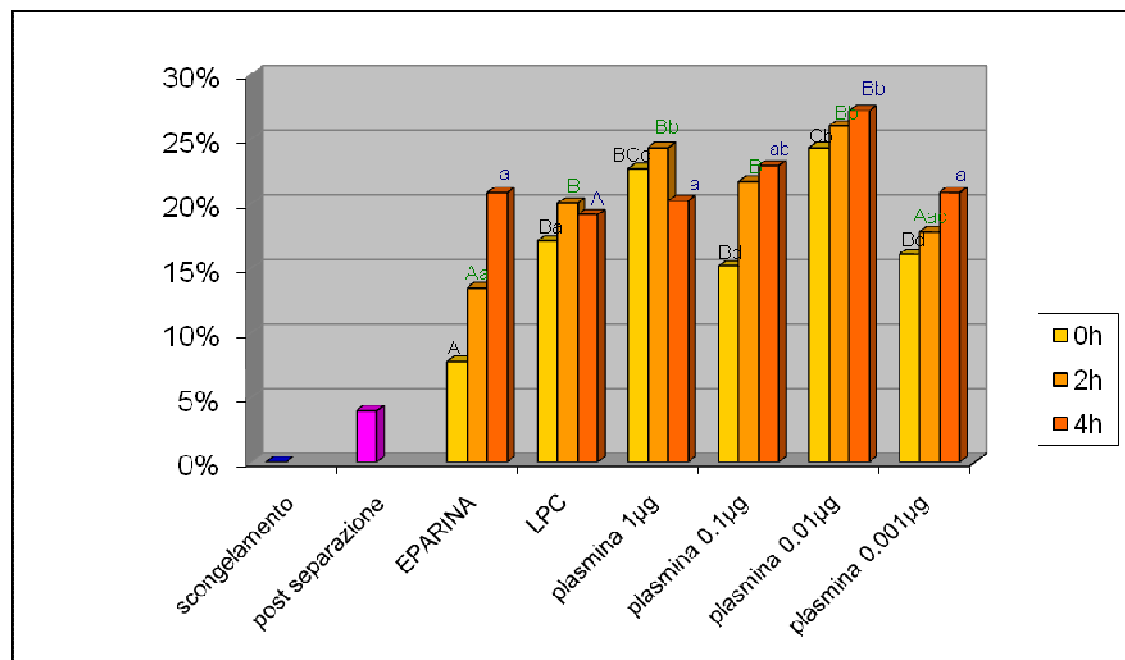
Un dato interessante che vale la pena sottolineare è che la vitalità a 4 ore era ancora alta nei diversi gruppi sperimentali, con i valori minori nel gruppo LPC (81.1%) ed i maggiori (93.5%) nel gruppo esposto alla maggiore concentrazione di plasmina. Il dato più saliente è che nei gruppi con le due concentrazioni maggiori di plasmina (1 e 0.1 μ g/ml) è stata osservata una vitalità comparabile (93.5 e 88.5%) a quella registrata al momento dello scongelamento e del post-swim-up. Anche a 4 ore si è confermato un effetto negativo della LPC sulla vitalità spermatica che è risultata ridotta significativamente. Un dato inatteso, invece, è stato quello della diminuzione di vitalità osservata nei gruppi trattati con plasmina alle due concentrazioni inferiori (84.9 e 86.6%).

Indipendentemente dal trattamento è stata osservata una diminuzione della vitalità spermatica all'aumentare delle ore di incubazione. Tuttavia, per osservare meglio l'effetto del tempo è stato ritenuto opportuno confrontare, per ciascun trattamento, la vitalità riscontrata ai diversi tempi di incubazione.

In tutti i gruppi è stata riscontrata una diminuzione di vitalità all'aumentare del tempo, ad eccezione del gruppo plasmina 0.1µg/ml che però era proprio quello partito al tempo 0 con una ridotta vitalità; comunque nel gruppo LPC questo fenomeno è risultato molto più accentuato, ad indicare una certa tossicità di questa sostanza.

I risultati che si riferiscono all'induzione della RA sono mostrati in Figura 21. E' importante sottolineare che non è stato osservato neanche uno spermatozoo vivo con RA allo scongelamento mentre la percentuale di reazione acrosomiale post-separazione con swim-up è stata molto contenuta (4%) e non diversa da quella riscontrata nel gruppo controllo, cioè quello esposto a sola eparina per 10 minuti, senza ulteriori trattamenti (7.8%).

Figura 21. Effetto della plasmina sulla % RA calcolata sui vivi ai differenti tempi sperimentali



A,B,C Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0.01$

a,b,c Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0.01$

E' stato dimostrato un ruolo della plasmina nell'induzione *in vitro* della RA degli spermatozoi di bufalo sin dal tempo 0. In particolare, la plasmina a tutte le concentrazioni impiegate ha incrementato significativamente ($P<0.01$) la percentuale di spermatozoi con RA rispetto al controllo con eparina (22.7, 15.2, 24.4, 16.1 e 7.8%, rispettivamente nei gruppi plasmina 1 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 0.01 μ g/ml e 0.001 μ g/ml ed eparina).

Un altro dato interessante è che l'effetto della plasmina è risultato sovrapponibile a quello della LPC (17.1%), noto agente inducente la RA (controllo positivo) in spermatozoi capacitati. Addirittura la plasmina alla concentrazione 0.01 μ g/ml ha dato una percentuale di RA maggiore ($P<0.05$) rispetto alla LPC.

Dopo 2 ore di incubazione con eparina sia la LPC che la plasmina alle concentrazioni 1, 0.1, 0.01 μ g/ml hanno incrementato la RA rispetto al controllo eparina (20.1, 24.4, 21.7, 26 e 13.5% rispettivamente nei gruppi LPC, plasmina 1, 0.1, 0.01 μ g/ml e controllo eparina). Al contrario, la concentrazione inferiore (0.001 μ g/ml) di plasmina ha dato percentuali di RA (17.8%) simili a quelle del gruppo controllo.

Dopo 4 ore di incubazione le differenze nelle percentuali di RA tra gruppi tendono a ridursi (20.9, 19.2, 20.3, 22.9, 27.2 e 20.9% rispettivamente nei gruppi controllo eparina, LPC, plasmina 1, 0.1, 0.01, 0.001 μ g/ml).

In particolare anche il solo trattamento con eparina (controllo) stimola la RA in misura sovrapponibile alla LPC ed alla plasmina alle concentrazioni 1, 0.1 e 0.001 μ g/ml mentre i migliori risultati si osservano nel gruppo trattato con plasmina 0.01 μ g/ml. In questo gruppo la % di RA è maggiore ($P<0.01$) rispetto

alla LPC e a tutti gli altri gruppi ($P < 0.05$), mentre valori intermedi si osservano nel gruppo $0.1 \mu\text{g/ml}$.

Se confrontiamo per ciascun trattamento l'effetto del tempo di incubazione osserviamo che l'eparina determina un aumento della percentuale di RA all'aumentare delle ore di incubazione. Solo in un altro gruppo sono emerse delle differenze tra il tempo 0 ed i due tempi successivi (ma non tra le 2 e le 4 ore) e questo gruppo è proprio quello in cui, al tempo 0, sono state riscontrate ridotte vitalità e RA (la differenza in questo caso si evidenzia perché i valori iniziali sono inferiori). Al contrario, il trattamento per 10 min con LPC o plasmina non varia in funzione del tempo in cui il seme è stato capacitato; in altri termini l'effetto inducente la RA si manifesta subito.

Un altro risultato interessante emerso nel corso della prova riguarda la motilità spermatica. Mentre al tempo 0, non sono state apprezzate differenze nella motilità spermatica (90% in tutti i gruppi), ai tempi successivi la plasmina, a tutte le concentrazioni testate, ha avuto un effetto positivo sulla motilità rispetto ai gruppi controllo e LPC. In particolare a 2 ore post-incubazione nei gruppi trattati con plasmina la motilità è stata pari al 90% rispetto al 75% dei gruppi controllo e LPC. Inoltre lo stesso fenomeno è stato osservato a 4 ore, tempo in cui la motilità nei gruppi plasmina era del 75% rispetto al 60% degli altri due gruppi.

Discussione

I risultati di questo esperimento hanno dimostrato che la plasmina induce la reazione acrosomiale *in vitro* in spermatozoi capacitati di bufalo. L'incremento delle percentuali di spermatozoi andati incontro a RA dopo trattamento con

plasmina non è imputabile a morte cellulare e successiva lisi acrosomiale, come indicato dalla preservata vitalità spermatica fino a 4 ore di incubazione.

L'effetto della plasmina osservato in questo studio è stato, in generale, sovrapponibile a quello della LPC, noto agente induttore della RA *in vitro*, che rappresentava appunto il nostro controllo positivo. Addirittura alla concentrazione 0.01µg/ml la plasmina ha dato percentuali di spermatozoi con RA superiori rispetto a quelle registrate dopo il trattamento con la LPC al tempo 0 e a 4 ore di incubazione.

In realtà non è stata identificata una concentrazione ottimale di utilizzo di questa proteasi in quanto: al tempo 0 in tutte le concentrazioni testate è stato riscontrato un incremento della RA rispetto al controllo negativo, a 2 ore di incubazione la concentrazione più bassa è stata la sola ininfluyente, e a 4 ore le differenze tra gruppi si sono pressoché annullate e la concentrazione di plasmina competitiva è risultata essere quella di 0.01µg/ml.

Quest'ultimo fenomeno può essere spiegato considerando che il gruppo di controllo negativo, cioè quello semplicemente incubato in presenza di eparina, all'aumentare delle ore di incubazione, ha dato percentuali di RA sovrapponibili a quelle dei gruppi trattati. In altri termini l'eparina, che era stata impiegata per capacitare il seme, ha esplicato anche un'azione inducente la RA che è risultata essere dipendente dal tempo.

Nonostante l'eparina sia considerata il fattore capacitante *in vitro* per antonomasia, una funzione della stessa sulla RA era stata già descritta in precedenza nel bovino (Ooba et al., 1990) e nel bufalo (Chauhan et al., 1997). In uno studio in cui erano stati confrontati eparina e calcio ionoforo come agenti induttori la RA nel bufalo, era stato dimostrato che l'effetto dell'eparina è

fortemente condizionato dal tempo di esposizione; in particolare, mentre un trattamento di 30 minuti con il calcio ionoforo era sufficiente ad indurre la RA, per osservare un incremento significativo della RA, l'incubazione con eparina doveva essere protratta almeno fino a 3-5 ore.

I nostri risultati si accordano perfettamente con quelli riportati da Kitiyanant et al. (2002): infatti, la percentuale di RA al tempo 0 è stata molto bassa mentre è andata aumentando ai tempi successivi, per raggiungere valori simili ai gruppi trattati con LPC e plasmina a 4 ore di incubazione. Potremmo ipotizzare che il ritardo dell'eparina nell'esplicare tale funzione sia riferibile alla sua duplice funzione: in un primo momento di capacitazione, e, successivamente, di induzione della RA.

I risultati ottenuti nel corso del presente studio, però, mostrano alcune interessanti differenze con un lavoro simile effettuato nella specie bovina (Taitzoglou et al., 2002). In quest'ultimo, la RA al tempo 0 era praticamente assente nei diversi gruppi sperimentali (medium controllo, LPC e diverse concentrazioni di plasmina), aumentava leggermente dopo 2 ore di incubazione, non superando valori del 5 %, per raggiungere valori più elevati solo a 4 ore di incubazione. Inoltre, pur essendosi dimostrato un effetto della plasmina sulla RA, la maggiore efficacia era stata ottenuta con la LPC.

Nel nostro studio sia la LPC sia la plasmina hanno avuto un effetto immediato, come dimostrato dalle alte percentuali di RA riscontrate sin dal tempo 0. Ciò suggerisce che i processi di capacitazione e di RA si sono svolti anticipatamente. Questa marcata differenza nella dinamica degli eventi può essere riconducibile al fatto che nel nostro studio è stato utilizzato seme

congelato/scongelato mentre nel lavoro di Taitzoglou et al. (2002) il seme impiegato era fresco.

E' noto che il congelamento come tale, così come i lavaggi normalmente impiegati in laboratorio per la separazione della componente spermatica, possono destabilizzare la membrana spermatica e, quindi, accelerare il processo di capacitazione.

In tutti i tempi considerati nel corso del nostro studio si è osservata una elevata vitalità degli spermatozoi, e questo dato ci consente di escludere che ci siano stati danni acrosomiali (falsa RA); piuttosto è verosimile ipotizzare che i tempi di espletamento dei processi di capacitazione e RA siano stati in qualche modo velocizzati: a conferma di quanto detto Florman (1994) ha riportato che l'ingresso dello ione Ca^{++} è accelerato negli spermatozoi congelati/scongelati rispetto che in quelli freschi, con una conseguente RA accelerata.

Un altro aspetto interessante da considerare riguarda la vitalità spermatica osservata nei diversi gruppi ai differenti tempi di incubazione. Il dato più saliente a riguardo è la diminuita vitalità osservata dopo il trattamento con LPC a tutti i tempi considerati, che starebbe ad indicare una certa tossicità di questa sostanza. Al contrario, la plasmina in generale non ha esercitato effetti negativi sulla vitalità spermatica: una ridotta vitalità è stata osservata solo al tempo 0 per una concentrazione intermedia ($0.1\mu\text{g/ml}$) ed al tempo 4 ore per le due concentrazioni inferiori (0.01 e $0.001\mu\text{g/ml}$).

Nel primo caso riteniamo che la riduzione di tale parametro possa essere semplicemente ascrivibile ad una casuale distribuzione in quel gruppo di spermatozoi meno vitali di partenza dato che ai tempi successivi, quando la vitalità dovrebbe diminuire, il fenomeno non è stato più osservato. Anche la

diminuita vitalità a 4 ore nei gruppi trattati con le due concentrazioni inferiori di plasmina (0.01 e 0.001 µg/ml) è di difficile interpretazione. E' possibile ipotizzare che la plasmina eserciti una funzione positiva nel preservare la vitalità spermatica e che, pertanto, le due concentrazioni inferiori, non siano sufficienti a garantire questo effetto protettivo.

Infine, un altro risultato molto interessante emerso nel corso del presente studio è l'effetto positivo della plasmina, a tutte le concentrazioni da noi testate, sulla motilità spermatica. Non è stato possibile apprezzare da subito tale effetto in quanto al tempo 0 la motilità spermatica era molto elevata in tutti i gruppi (90%). Tuttavia, mentre, come prevedibile, la motilità è andata decrescendo all'aumentare del tempo di incubazione nel gruppo controllo (solo eparina) e nel gruppo trattato con LPC, questo parametro si è mantenuto su valori elevati quando gli spermatozoi erano esposti alla plasmina: a 2 ore di incubazione la plasmina ha determinato un incremento significativo della motilità sia rispetto al controllo che al gruppo trattato con LPC (90% vs 75 %) e lo stesso fenomeno è stato osservato a 4 ore (75% vs 60%). Questi risultati suggeriscono che la plasmina sia coinvolta anche nell'induzione del fenomeno dell'iperattivazione degli spermatozoi di bufalo, analogamente a quanto dimostrato in precedenza nella specie bovina (Taitzoglou et al., 2004).

3 Conclusioni

L'allevamento del bufalo rappresenta, in Italia, un'importante risorsa la cui competitività è confermata dall'incremento del patrimonio nazionale di animali che si è registrato negli ultimi anni. Nonostante le vicissitudini legate alle problematiche igienico-sanitarie di alcune province dell'area del DOP il mercato della mozzarella di bufala campana DOP ha fatto registrare in questi ultimi anni un incremento della richiesta che ha portato ad un aumento del prezzo della mozzarella e di conseguenza del latte. In quest'ultimo periodo l'attacco mediatico subito dal settore ha incrementato la disaffezione dei consumatori nei confronti dei prodotti derivati dalla lavorazione del latte e della carne della specie bufalina. A tal proposito si è verificato, in questi ultimi mesi, una drastica riduzione dei fatturati normalmente registrati dall'indotto creato dall'allevamento della specie bufalina, innescando una crisi in un settore che ha rappresentato un valido esempio delle potenzialità competitive della zootecnia italiana nei confronti di quella europea. L'Italia può vantare, in ambito europeo, circa l'85% della popolazione bufalina, con i suoi 318.158 esemplari (2006), di cui oltre il 70% concentrati nel meridione ed in particolare in Campania (233.771 unità). Tale allevamento presenta tuttora un trend positivo e su esso molti imprenditori continuano ad investire. Dall'elaborazione dei dati relativi alla consistenza della popolazione bufalina e da stime rilevate tenendo conto della produzione di latte pro-capite (bollettino AIA, anno 2000), si calcola che la quantità di mozzarella di bufala prodotta in Italia si aggira per le aziende della sola zona del DOP, sui 300.000 quintali. In considerazione delle oltre 2700 aziende bufaline presenti e dei 200 caseifici operanti nella zona DOP, questo settore è una realtà con un

notevole impatto socioeconomico, in quanto si è sviluppato proprio in quelle regioni che detengono un alto tasso di disoccupazione. L'intero indotto bufalino occuperebbe nella sola Campania circa 15.000 addetti.

Le regole della competizione, la richiesta di latte e la pressione dei costi fissi di produzione sono di continuo stimolo al miglioramento produttivo che, in questo ambito, è strettamente collegato al miglioramento genetico. Il continuo incremento dei costi di gestione dell'allevamento del bufalo, registrato in questi ultimi anni, non accompagnato da un adeguato aumento del prezzo del latte e dalla valorizzazione della carne, potrebbe, in un prossimo futuro, favorire una crisi del settore. Risulta, pertanto, fondamentale operare una diluizione dei costi fissi attraverso piani di selezione che favoriscano la produttività individuale e migliorino il rapporto tra la domanda e l'offerta. Questi piani di selezione non potranno, quindi, prescindere dall'utilizzo delle biotecnologie della riproduzione (Inseminazione artificiale, embryo transfer, OPU) che consentono di accelerare il progresso genetico di questa specie, scongiurando così eventuali crisi del settore.

Al momento la tecnologia IVEP rappresenta il miglior modo per esaltare il contributo materno al miglioramento genetico, a causa delle limitazioni ormai dimostrate dei programmi della MOET in questa specie (Zicarelli, 1997; Misra et al, 1997).

E', inoltre, opportuno enfatizzare che l'ottimizzazione del sistema IVEP, potrebbe favorire anche gli scambi di materiale genetico dall'Italia ad altri Paesi in cui vengono allevate bufale. In tal modo si creerebbe un ulteriore indotto e nuove prospettive occupazionali attraverso l'apertura di una via commerciale per la vendita di materiale genetico, favorendo, tra l'altro, il miglioramento

genetico e la riconversione del patrimonio bufalino in altri Paesi del mondo e, in special modo, in quelli che risultano deficitari di proteine. E' noto, infatti, che la bufala, grazie all'origine tropicale, risulta facilmente adattabile e presenta delle performance produttive particolarmente interessanti proprio nei Paesi a clima tropicale e sub tropicale che risultano maggiormente deficitari in termini di alimentazione umana (Paesi in via di sviluppo). L'ottimizzazione dell'efficienza delle tecnologie riproduttive, quindi, faciliterebbe gli scambi commerciali di materiale genetico di questa razza bufalina allevata in Italia (Razza Mediterranea Italiana) che, per la sua migliore resa produttiva, ottenuta grazie ad anni di selezione genetica, è una delle razze invidiate e richieste sia nei Paesi in via di sviluppo sia nei Paesi ad alta industrializzazione.

Sebbene l'efficienza dell'IVEP sia enormemente aumentata in questi ultimi anni (Gasparrini et al, 2002; Gasparrini et al, 2004; Gasparrini, 2006), grazie all'acquisizione di nuove conoscenze ed all'evidenziazione di esigenze specie-specifiche, e siano state ottenute gravidanze a termine (Madan et al, 1994; Neglia et al, 2004), diverse problematiche restano ancora irrisolte.

Tra queste ricordiamo il basso recupero di oociti per bufala, che ne rappresenta una limitazione intrinseca difficilmente correggibile, in quanto trae le sue origine dalle caratteristiche fisiologiche proprie di una specie stagionale, e le basse percentuali di gravidanze a termine riportate dopo il trasferimento degli embrioni IVP, imputabili alla minore vitalità degli stessi, che potrebbe essere il risultato di condizioni sub-ottimali durante la fecondazione e coltura in vitro.

In particolare, una fase particolarmente critica del sistema IVEP in questa specie è rappresentata dalla fecondazione in vitro, come dimostrato dal basso tasso di cleavage (in media non superiore al 60%) riportato in letteratura da tutti

gli autori operanti in questa specie nel mondo (Gasparrini, 2002; Neglia et al, 2003).

In questo studio si è voluto focalizzare l'attenzione proprio sulla fase della fecondazione, con una serie di esperimenti finalizzati ad analizzare alcuni fattori che giocano un ruolo fondamentale nel corso di momenti diversi del processo fecondativo. I risultati ottenuti nel corso dei vari esperimenti hanno consentito di delucidare alcuni aspetti che devono essere tenuti in considerazione ai fini della ottimizzazione dell'efficienza IVEP nel bufalo.

I risultati dell' Esperimento 1. del presente elaborato hanno evidenziato l'importanza del fattore toro, dimostrando che, nel bufalo, molto più che in altre specie, il cosiddetto "effetto toro" ha un peso rilevante sull'efficienza del sistema in vitro. Più precisamente abbiamo dimostrato che tori diversi, oltre a possedere capacità fecondanti molto diverse (solo una bassa percentuale dei tori bufalini testati viene poi ritenuta idonea per la IVF), rispondono in maniera diversi agli agenti capacitanti in vitro. L'importanza di questi dati risiede nell'aver evidenziato che la bassa fertilità in vitro di alcuni tori potrebbe essere almeno in parte riferibile all'impiego di un fattore capacitante inadatto nel sistema di IVF. Ne consegue la necessità di effettuare uno screening preliminare del seme dei vari tori, completando quello eseguito di routine nell'ambito dei Centri Tori (fertility test), con la valutazione della risposta ad agenti capacitanti diversi. Ciò consentirebbe di scegliere il fattore capacitante in funzione del toro coinvolto nel programma di IVF e, conseguentemente, migliorarne il potenziale fecondante.

Nel corso dell'Esperimento 2. è stato dimostrato che la melatonina ha una azione inducente il processo di capacitazione spermatica in vitro nel bufalo, con un'efficacia sovrapponibile a quella dell'eparina, fattore universalmente utilizzato a tale scopo nella maggioranza delle specie domestiche. Questo effetto è stato osservato a tutte le concentrazioni testate (10 μ M, 100 μ M e 1 mM) e non è stato evidenziato un effetto tossico neanche alla maggiore concentrazione, suggerendo di ampliare ulteriormente il range in studi futuri per poter individuare la concentrazione ottimale d'impiego.

I risultati di questo esperimento hanno delle rilevanti implicazioni considerando, da una parte, la stagionalità della specie e, dall'altra, la forte variabilità nella capacità fecondante di tori bufalini diversi.

E' opportuno ricordare che nel nostro studio è stato utilizzato un pool di materiale seminale proveniente da quattro tori diversi, e, alla luce di quanto osservato nel primo esperimento, sarebbe interessante, in studi successivi, valutare l'effetto capacitante di questa sostanza in funzione del toro utilizzato, nonché della stagione di prelievo.

E' ipotizzabile, infatti, che le concentrazioni di melatonina nel plasma e nel liquido seminale varino in funzione della stagione di prelievo e del soggetto, e che un pretrattamento del seme con la melatonina prima della crioconservazione o comunque prima della fecondazione in vitro possa migliorare la capacità fecondante dei tori ipofertili nella stagione a fotoperiodo positivo.

Come già ampiamente descritto l'ottimizzazione del sistema di IVF non può prescindere dalla composizione del microambiente tubarico, in quanto l'ovidutto

è l'organo in cui in natura si verificano la capacitazione spermatica, la reazione acrosomiale, la fecondazione e lo sviluppo embrionale precoce. Entrambi i gameti e gli embrioni vengono in contatto con l'epitelio tubarico e con le secrezioni presenti a questo livello. Nel corso di questo lavoro abbiamo provato a mimare in vitro l'ambiente tubarico mediante due approcci diversi: cercando di ricreare in vitro le condizioni che i gameti incontrano in natura all'atto della fecondazione e, più precisamente, utilizzando cellule oviduttali in coltura (BOEC) e inserendo come supplemento dei media normalmente utilizzati una proteina tubarica di particolare interesse, l'OPN, che sembrerebbe giocare un ruolo chiave nella regolazione degli eventi riproduttivi precoci. Entrambi gli approcci sono stati coronati da successo, come attestato dai risultati emersi nel corso degli Esperimenti 3. e 4.

I risultati dell'Esperimento 3. hanno dimostrato che le BOEC esercitano un'influenza positiva sul processo di fecondazione in vitro nel bufalo. In particolare, è stato dimostrato che l'incubazione degli spermatozoi di bufalo con le BOEC in coltura per 3 ore ne promuove la capacitazione e ne incrementa la motilità. I risultati ottenuti osservando l'effetto delle BOEC sulla fecondazione hanno poi dimostrato un incremento del tasso di fecondazione degli oociti quando l'inseminazione era eseguita su un monostrato di BOEC.

E' stato, inoltre, osservato che un pretrattamento del seme per 6 ore nel medium IVF contenente eparina o su di un monostrato di BOEC, prima della IVF, aumenta la percentuale di embrioni a stadio avanzato di sviluppo, suggerendo che il seme così trattato abbia acquisito prima la capacità fecondante, conseguendone una accelerazione dei tempi di penetrazione.

L'insieme di questi risultati suggerisce che l'utilizzo delle BOEC durante la fecondazione in vitro di bufalo possa rappresentare una valida strategia per ottimizzare l'efficienza IVEP in questa specie.

Inoltre è stato dimostrato (Esperimento 4a) che la OPN induce la capacitazione in vitro degli spermatozoi di bufalo e, aggiunta al medium di IVF, migliora il tasso di fecondazione e di sviluppo embrionale. I risultati ottenuti con questa proteina sulla capacitazione in vitro sono stati sovrapponibili da un punto di vista statistico a quelli registrati con l'eparina, il più noto ed utilizzato fattore capacitante in vitro, ad entrambi i tempi considerati. Tuttavia vale la pena sottolineare che l'eparina dopo due ore di incubazione risultava inefficace fornendo valori simili al controllo negativo e, quindi, richiedeva più tempo per agire, mentre l'OPN era efficace sin dal primo tempo considerato e dava comunque valori tendenzialmente superiori all'eparina, seppur non statisticamente significativi. Ne consegue che l'OPN potrebbe essere considerata una valida alternativa all'eparina per la capacitazione spermatica nel bufalo o, ancora meglio potrebbe essere interessante andare ad investigare l'effetto combinato delle due sostanze poichè l'OPN contiene un sito di legame per il Ca^{2+} e due domini di legame per l'eparina, ed è, pertanto ipotizzabile che l'interazione dell'eparina con la membrana spermatica possa essere mediata proprio dall'OPN.

I risultati di questo studio suggeriscono di verificare se il pretrattamento del seme con OPN prima della sua incubazione con gli oociti possa tradursi in un ulteriore miglioramento della efficienza IVEP. In questo modo gli spermatozoi pretrattati con OPN incontrerebbero gli oociti già in uno stato capacitato. Il

vantaggio ipotizzato è essenzialmente riferibile al fatto che, inseminando gli oociti con spermatozoi già capacitati, si ridurrebbero i tempi di penetrazione, evitando il rischio del cosiddetto “invecchiamento” della cellula uovo. E’ noto, infatti, che gli oociti di bufalo sono particolarmente sensibili a questo fenomeno, come indicato dalla migliore efficienza IVEP ottenuta anticipando il momento dell’inseminazione in vitro (18-21 ore) e da palesi aspetti di deterioramento qualitativo degli oociti che si osservano già a partire dalla ventiquattresima ora post-IVM, superata la quale, sia il tasso di fecondazione, sia le rese embrionali, risultano fortemente ridotte (Gasparrini et al., 2008).

Un altro aspetto che va tenuto in considerazione è che nel bufalo la durata ottimale di co-incubazione dei gameti è stata stimata intorno alle 16 ore, sulle basi della velocità di penetrazione (Gasparrini et al., 2008). Quest’ultimo parametro varia in funzione del toro, come precedentemente dimostrato (Di Fenza M. et al., 2008), ma indipendentemente dal toro, la penetrazione spermatica in questa specie richiede in media un tempo piuttosto lungo e senz’altro maggiore rispetto alla specie bovina (Ward F. et al., 2002). Questi due aspetti tipici della specie, cioè il precoce invecchiamento in vitro degli oociti ed il maggior tempo richiesto per la penetrazione spermatica, potrebbero essere le cause della minore efficienza di fecondazione riscontrata in questa specie.

Per le suddette ragioni si ritiene fondamentale approfondire questi studi in modo da identificare il migliore utilizzo di questa proteina nell’ambito del sistema in vitro perché si possa giungere all’ottimizzazione dell’efficienza IVEP nel bufalo.

Infine l’osservazione dell’influenza positiva esercitata dall’aggiunta di questa sostanza nel medium di IVF (Esperimento 4b) conferma che l’individuazione di

molecole chiave coinvolte attivamente nella regolazione degli eventi precoci della fecondazione e dell'embriogenesi ha un'estrema importanza ai fini dell'ottimizzazione dell'efficienza IVEP nel bufalo. E' stato, infatti, dimostrato che l'incorporazione nel sistema di IVF del bufalo dell'OPN, una proteina normalmente presente nel fluido tubarico e in altri tessuti e fluidi riproduttivi, ha determinato un sensibile miglioramento dell'efficienza IVEP in questa specie. L'effetto promuovente è stato osservato sia sul processo di fecondazione, come indicato dal miglioramento della percentuale di cleavage, generalmente bassa in questa specie, sia sullo sviluppo embrionale successivo, come attestato dalle più elevate rese embrionali e dalla migliorata qualità degli embrioni prodotti.

Per le suddette ragioni si ritiene fondamentale approfondire e completare questi studi con il trasferimento degli embrioni prodotti in presenza di OPN, in maniera da verificare le percentuali di gravidanze a termine.

L'insieme dei risultati ottenuti nell'Esperimento 5. hanno dimostrato che la plasmina ha un effetto inducente la RA *in vitro* negli spermatozoi capacitati di bufalo, e che tale effetto è competitivo rispetto a quello ottenuto con la LPC, sostanza fusogenica normalmente impiegata per indurre la RA *in vitro* in diverse specie. L'aumento della motilità progressiva osservato depone a favore di un ruolo della plasmina nell'innescare l'iperattivazione spermatica, egualmente necessaria allo spermatozoo per penetrare la cellula uovo. L'importanza di questo lavoro, quindi, risiede nell'aver evidenziato un ruolo critico del sistema PA/plasmina nella fecondazione *in vitro* (IVF) nel bufalo. Si ritiene, quindi, importante indagare, in studi futuri, l'effetto dell'aggiunta della plasmina al medium di IVF sul tasso di fecondazione e di rese embrionali.

In conclusione l'analisi di alcuni fattori che intervengono nel processo di fecondazione, effettuata nel corso di questo lavoro, ha consentito di evidenziare alcuni aspetti fondamentali che vanno considerati nell'allestimento del sistema di IVF nella specie bufalina allo scopo di ottimizzare l'efficienza IVEP. L'esempio più rappresentativo è quello fornito dall'Esperimento 4, in cui, oltre ad aver dimostrato un ruolo chiave dell'OPN nel processo di capacitazione spermatica, è stato provato che l'inserimento della proteina in questione nel sistema in vitro consente di incrementare in maniera sensibile sia il tasso di fecondazione sia le rese embrionali. Inoltre, nel corso degli altri esperimenti sono stati ottenuti risultati interessanti che pongono le basi per lo sviluppo di future strategie finalizzate ad un ulteriore miglioramento dell'efficienza di fecondazione nel bufalo.

4 Bibliografia

- Agarwal A, Makker K & Sharma R (2008) Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *American Journal of Reproductive Immunology* 59 2–11.
- Ahluwalia, B., Farhori, P., Jamuar, M., Bacceti, B. & Anderson, W.A. (1990) Specific localization of lectins in boar and bull spermatozoa. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 22, 53–62.
- Almeida, E.A., Huovila A.P., Sutherland A.E., Stephens L E, Calarco P.G., Shaw L.M., Mercurio A.M, Sonnenberg A., Primakoff P., Myles D.G, and White J. M.. (1995). Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor 116. *Cell* 81:1095-1104.
- Amante L., Campanile G., Ciotola F., Coletta A., De Rosa C., Di Palo R., Peretti V., Zicarelli L. (2001) Studio preliminare sulle caratteristiche morfo-funzionali della bufala mediterranea italiana. Approccio alla valutazione lineare computerizzata. Opuscolo pubblicato nell' ambito del 1° congresso Nazionale sull' allevamento del Bufalo-Eboli (SA).
- Bacci M.L., Galeati G., Mattioli M., Boni R., Seren E. (1991) In vitro maturation and in vitro fertilization of buffalo oocytes. *Proc III World Buffalo Congress, Varna*, 599-603.
- Ball G.D., Leibfried M.L., Lenz R.W., Ax R.L., Bavister B.D., First N.L. (1983) Factors affecting successful in vitro fertilization. *Biol Reprod.*;28:717-725.
- Banks, W. J. (1992) Sistema reprodutor feminino. In: BANKS, W. J. *Histologia veterinária aplicada*. 6. ed. São Paulo: Manole p. 565-588.
- Baruselli P.S, Mucciolo R.G, Visintin J.A ,Viana W.G, Arruda R.P, Madureira E.H, Oliveira C.A, Molero-Filho J.R. (1997) Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus Bubalis*). *Theriogenology JUn*;47(8):1531-47;
- Baruselli PS, de Sa Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MF, Barros CM, Bo GA. (2006) Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*; 65 (1): 77-88;
- Beers W.H. (1975) Follicular plasminogen and plasminogen activator and the effect of plasmin on ovarian follicle wall. *Cell* 6:379–386.

- Benau D.A., Storey B.T. (1987) Characterization of the mouse sperm plasma membrane zona-binding site sensitive to trypsin inhibitors. *Biol Reprod* 36:282–292.
- Benau D.A., Storey B.T. (1988) Relationship between two types of mouse sperm surface sites that mediate binding of sperm to the zona pellucida. *Biol Reprod* 39:235–244.
- Berger, T. (1990) *Pisum sativum* agglutinin used as acrosomal stain of porcine and caprine sperm. *Theriogenology* 33, 689–695.
- Bleil J.D., Beall C.F., Wassarman P.M. (1981) Mammalian sperm–egg interaction: fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP2. *Dev Biol* 86:189–197.
- Boatman DE, Robbins RS. (1991) Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility and acrosome reactions. *Biol reprod*; 44: 806-813.
- Boccia L., Attanasio L., De Rosa A., Pellerano G., Di Palo R., Gasparrini B. (2007) Effect of sodium nitroprusside on buffalo sperm capacitation in vitro. *Reprod Fertil Dev* 19, 276
- Boccia L., Attanasio L., Monaco E., De Rosa A., Di Palo R., Gasparrini B. (2006a) Effect of progesterone on capacitation of buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa in vitro. *Reproduction in Domestic Animals* 41 (4), 311.
- Boccia L., De Rosa A., Attanasio L., Di Palo R., Zicarelli L., Gasparrini B. (2005) Capacitation of buffalo spermatozoa in vitro. *Reprod Fertil Dev* 17 (1,2), 270.
- Boccia L., Di Palo R., De Rosa A., Attanasio L., Mariotti E., Gasparrini B. (2007b) Evaluation of buffalo semen by Trypan blue/Giemsa staining and related fertility in vitro. *Proceedings of the 8th World Buffalo Congress, Caserta. Italian Journal of Animal Science* 2007; 6 (Suppl 2): 739-742;
- Boccia, L. (2006) Ottimizzazione dei protocolli di maturazione e fertilizzazione in vitro nella specie bufalina (*Bubalus bubalis*). PhD Degree Diss., Università degli Studi di Napoli “Federico II”, Italy.

- Boice, M. L., R. D. Geisert, R. M. Blair, and H. G. Verhage. (1990) Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus Biol Reprod 43:457-465.
- Boni R. (1994) In vitro production in bovine and buffalo species. Buffalo J., supplement 2:147-160.
- Boni R., Di Palo R., Barbieri V., Zicarelli L. (1994a) Ovum pick-up in deep anestrous buffaloes. Proc IV World Buffalo Congress; 3: 480-482.
- Boni R., Roviello S., Barbieri V., Zicarelli L. (1994b) In vitro embryo production in buffalo species. Atti XLVIII Convegno Nazionale SISVET;1:307-312.
- Boni R., Roviello S., Gasparrini B., Langella M., Zicarelli L. (1999) In vitro production of buffalo embryos in chemically defined medium. Buffalo J;1:115-120.
- Boni R., Roviello S., Gasparrini B., Zicarelli L. (1997) Pregnancies established after transferring embryos yielded by Ovum Pick-Up and in vitro embryo production in Italian buffalo cows. V World Buffalo Congress, Caserta: 787-792;
- Boni R., Roviello S., Zicarelli L. (1996) Repeated ovum pick-up in Italian Mediterranean buffalo cows. Theriogenology;46:899-909
- Boni R., Santella L., Dale B., Roviello S., Di Palo R., Barbieri V. (1992) An ultrastructural study of maturation in buffalo oocytes. Acta Medica Veterinaria 38, 153-161
- Boni R., Wurth Y.A., Roviello S., Barbieri V., Kruip TH.A.M.. (1993) Effetto della distanza tra prelievo e recupero sulle caratteristiche morfologiche e sull'efficienza di produzione embrionale in vitro di oociti prelevati mediante Ovum Pick-up - Proc. XLVII S.I.S.Vet. 1: 475-480.
- Brackett, B. G., D. Bousquet, M. L. Boice, W. J. Donawick, J. F. Evans, and M. A. Dressel. (1982). Normal development following in vitro fertilization in the cow Biol Reprod 27:147-158.
- Brown CR, Cheng WKT. (1986) Changes in composition of the porcine zona pellucida during development of the oocyte to the 2-to 4-cell embryo. JEmbryol Exp Morph;92:183-191.

- Brown C.R. (1983) Purification of mouse sperm acrosin, its activation from proacrosin and effect on homologous egg investments. *J Reprod Fertil* 69:289–295.
- Brown, L. F., B. Berse, W. L. Van de, A. Papadopoulos-Sergiou, C. A. Perruzzi, E. J. Manseau, H. F. Dvorak, and D. R. Senger.. (1992) Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces 6. *Mol. Biol Cell* 3:1169-1180
- Cagnacci A., Paoletti A.M. Soldani R., Orrù M., Maschio E., Melis G.B. (1995) Melatonin enhances the luteinizing hormone and follicle stimulating hormone response to gonadotropin-releasing hormone in the follicular, but not in the luteal menstrual phase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 1095.
- Cagnacci A., Volpe A. (1996) Influence of melatonin and photoperiod on animal and human reproduction. *J. Endocrinol. Invest.* 19:382.
- Campanile G., Neglia G., Gasparrini B., Galiero G., Prandi A., Di Palo R., D'Occhio M.J., Zicarelli L. (2005) Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during decline in reproductive function Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during decline in reproductive function. *Theriogenology* 63 (8),2334-40
- Cancel, A. M., D. A. Chapman, and G. J. Killian. (1997) Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma *Biol Reprod* 57:1293-1301.
- Canipari R, O'Connell ML, Meyer G, Strickland S. (1987) Mouse ovarian granulosa cells produce urokinase-type plasminogen activator, whereas the corresponding rat cells produce tissue-type plasminogen activator. *J Cell Biol*;105:977–81.
- Caracciolo di Brienza V, Neglia G, Masola N, Gasparrini B, Di Palo R, Campanile G (2001) In vitro embryo production in chemically defined media. *Atti 1° Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo*, 3-5 ottobre, Eboli (SA), Italy, 341-344
- Carnegie, J. A., R. Durnford, J. Algire, and J. Morgan. (1997) Evaluation of mitomycin-treated Vero cells as a co-culture system for IVM/IVF-derived bovine embryos *Theriogenology* 48:377-389,.
- Carrel D.T., Middleton R.G., Peterson C.M., Jones K.P., Urry R.L. (1993) Role of the cumulus in the selection of the morphologically normal sperm and

induction of the acrosome reaction during human in vitro fertilization. Arch Androl;31: 133-137.

Casao A, Vega S, Palacín I, Pérez-Pe R, Laviña A, Quintín FJ, Sevilla E, Abecia JA, Cebrián-Pérez JA, Forcada F, Muiño-Blanco T (2008) Effects of Melatonin Implants During Non-Breeding Season on Sperm Motility and Reproductive Parameters in Rasa Aragonesa Rams.

Chantareprateep P., Lohachit C., Techakumphu M., Kobayashi G., Virakul P., Kunayongkrit A., Prateep P., Limskul A. (1989) Early embryonic development in thai swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). Theriogenology; 31, No. 6: 1131-1139.

Chauhan M.S., Katiyar P.K., Singla S.K., Manik R.S., Madan M.L. (1997a) Production of buffalo calves through in vitro fertilization. Ind. J. Anim. Sci.; 67: 306-308.

Chauhan M.S., Manik R.S., Singla S.K., Katiyar P., Madan M.L. (1997b) Effect of insulin on in vitro development of in vitro produced embryos in co-culture sistem. Ind. J. Anim. Prod . Manag.;13: 19-24.

Chauhan M.S., Palta P., Das S.K., Katiyar P., Madan M.L. (1997c) Replacement of serum and hormone additives with follicular fluid in the IVM medium: effect on maturation, fertilization and subsequent development of buffalo oocytes in vitro. Theriogenology;48: 461-469.

Chauhan M.S., Singla S.K., Manik R.S., Madan M.L. (1997d) Increased capacitation of buffalo sperm by heparin as confirmed by electron microscopy and in vitro fertilization. Indian Journal of Experimental Biology 35, 1038–1043.

Chauhan M.S., Singla S.K., Palta P., Manik R.S., Madan M.L. (1998) In vitro maturation and fertilization, and subsequent development of buffalo (*Bubalus Bubalis*) embryos: Effects of oocytes quality and type of serum. Reprod Fertil Dev 10, 173-177.

Chauhan M.S., Singla S.K., Palta P., Manik R.S., Madan M.L. (1999) Effect of epidennal growth factor on the cumulus expansion, meiotic maturation and development of buffalo oocytes in vitro. Vet Ret 144, 266-267.

Chemineau P, Malpaux B, Delgadillo JA, Gue´rin Y, Ravault JP, Thimonier J, et al. (1992) Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. Anim Reprod Sci;30:157–84

- Cheng, F. P., Fazeli, A. R., Voorthout, W., Bevers, M. M. & Colenbrander, B. (1996) Use of PNA (peanut agglutinin) to assess the acrosomal status and zona pellucida induced acrosoma reaction in stallion spermatozoa. *Journal of Andrology* 17, 674– 682.
- Chian R.C., Niwa K., Nakahara H. (1992) Effect of sperm penetration in vitro on completion of first meiosis by bovine oocytes arrested at various stages in culture. *J Reprod Fertil* 96,73-78
- Chian R.C., Park C.K., Sirard M.A. (1996). Cumulus cells act as a sperm trap during in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 45: 258.
- Christensen, P., Whitfield, C. H. & Parkinson, T. J. (1996) In vitro induction of acrosome reactions in stallion spermatozoa by heparin and A23187. *Theriogenology* 45, 1201–1210.
- Christman J.K., Silverstein S.C., Acs G. (1977) Plasminogen activator. In: *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*. Barrett AJ (ed) Elsevier North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp 91–149.
- Chuangsoongneon U., Kamonpatana M.. (1991) Oocyte maturation, in vitro fertilization and culture system for developing preimplantation Swamp buffalo embryos using frozen-thawed semen. *Buffalo J* 7,189-198.
- Cox J.F., Hormazabal J., Santa Maria A. (1993) Effect of cumulus on in vitro fertilization of bovine matured oocytes. *Theriogenology*; 40: 1259-1267.
- Craig, A. M. and D. T. Denhardt. (1991) The murine gene encoding secreted phosphoprotein 1 (osteopontin): promoter structure, activity, and induction in vivo by estrogen and progesterone *Gene* 100:163-171.
- Cross, N. L., Morales, P., Overstreet, J. W. & Hanson, F. W. (1985) Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Research* 15, 213–226.
- Danell B (1987) "Oestrus behaviour, ovarian morphology and cyclic variations in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers" PhD thesis, Uppsala, Sweden: Sveriges Lantbruksuniversitet.
- Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L (1985) Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res* 44:139–266.

- De Matos D. G., Gasparrini B., Pasqualini S. R., Thompson J. G. (2002) Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology*; 57: 1443-1451.
- De Matos D.G., Furnus C.C. (2000) The importance of having high glutathione level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology*; 53 (3): 761-771.
- De Matos D.G., Furnus C.C., Moses D.F. (1997) Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprod* 57, 1420-1425
- De Matos D.G., Furnus C.C., Moses D.F., Martinez A.G., Matkovic M. (1996) Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Molec. Reprod. Dev.*; 45: 451-457.
- De Rosa A. (2008) Crioconservazione di embrioni di bufalo (*Bubalus bubalis*) prodotti in vitro mediante tecniche innovative di vitrificazione. Dottorato thesis, Università degli Studi di Napoli Federico II.
- Delgado, N. M., Reyes, R., Mora-Galindo, J. & Rosado, A. (1988) Size-uniform heparin fragments as nuclear decondensation and acrosome reaction inducers in human spermatozoa. *Life Science* 42, 2177–2183.
- Denhardt DT, Guo X. (1993) Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J*;7:1475–82.
- Di Fenza M., De Rosa A., Boccia L., Attanasio L., Campanile G., Zicarelli L., Gasparrini B. (2008) Kinetics of sperm penetration in buffalo (*Bubalus bubalis*) species: effect of bull. Annual Conference of European Society of Domestic Animal Reproduction (ESDAR); *Reproduction in Domestic Animals*; 43 (5): 56.
- Di Francesco S, Mariotti E, Rubessa M, Campanile G, Di Palo R, Zicarelli L, Gasparrini B (2009). Effect of osteopontin on cleavage and blastocyst rates in buffalo species (*Bubalus bubalis*).
- Di Francesco S., Mariotti E., Tsantarliotou M., Sattar A., Venditto I., Rubessa M., Zicarelli L., Gasparrini B. (2010) Melatonin promotes in vitro sperm capacitation in buffalo (*Bubalus bubalis*). 36th Annual Conference of the

International Embryo Transfer Society, Cordoba, Argentina. Proc. on Journal of Reproduction Fertility and Development;

- Didion, B. A., Dobrinsky, J. R., Giles, J. R. & Graves, C. N. (1989) Staining procedures to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Research* 22, 51–57.
- Dodds, J. W. & Seidel, G. E. (1984) Effects of Ca^{2+} , capacitation time, and strain on in vitro fertilization in mice. *Gamete Research* 10, 353–360.
- Dominko T., First N.L. (1997) Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. *Mol Reprod Dev* 47,456-67
- Farlin, M. E., Jasko, D. J., Graham, J. K. & Squires, E. L. (1992) Assessment of *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 32, 23–77.
- Figenschau Y. and Bertheussen K. (1999) Enzymatic treatment of spermatozoa with a trypsin solution. *Int J Androl*;22:342–4.
- Finlay T.H., Katz J., Kirsch L., Levitz M., Nathoo S.A., Seiler S. (1983) Estrogen-stimulated uptake of plasminogen by the mouse uterus. *Endocrinology* 112:856–861.
- Florman H.M. and First N.L. (1989) The regulation of acrosomal exocytosis. Sperm capacitation is required for the induction of acrosomal reaction by the bovine zona pellucida in vitro. *Dev Biol*: 138:453-463.
- Florman, H. M., Bechtol, K. B. & Wassarman, P. M. (1984) Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor function for sperm. *Developmental of Biology* 106, 243– 255.
- Florman, H.M. (1994) Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca^{2+} are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Developmental of Biology* 165, 152–164.
- Forcada F, Abecia JA, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T, Valares JA, Palacin I, et al. (2006) The effect of melatonin implants during the seasonal anestrus on embryo production after superovulation in aged high-prolificacy Rasa Aragonesa ewes. *Theriogeneology*;65:356–65

- Fraser L.R. (1982) p-Aminobenzamidine, an acrosin inhibitor, inhibits mouse sperm penetration of the zona pellucida but not the acrosome reaction. *J Reprod Fertil* 65:185–194.
- Fraser, L. R., Abeydeera, L. R. & Niwa, K. (1995) Ca²⁺ regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Molecular Reproduction and Development* 40, 233–241.
- Fusi, F. M., M. Vignali, M. Busacca, and R. A. Bronson. (1992). Evidence for the presence of an integrin cell adhesion receptor on the oolemma of unfertilized human oocytes. *Mol. Reprod Dev.* 31:215-222.
- Fujinoki M. (2008) Melatonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm, *Reproduction* 136; 533-541
- Gabler, C., D. A. Chapman, and G. J. Killian. (2003) Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the oestrous cycle *Reproduction* 126:721-729
- Gadella B. M., Lopes-Cardozo M., van Golde L. M., Colenbrander B. & Gadella, T. W. Jr (1995) Glycolipid migration from the apical to the equatorial subdomains of the sperm head plasma membrane precedes the acrosome reaction: evidence for a primary capacitation event. *Journal of Cell Science* 108, 935–946.
- Galantino-Homer HL, Visconti PE, Kopf GS. (1997) Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3050-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod*; 56:707–19.
- Galli C., Duchi R., Crotti G., Lazzari G. (1998) Embryo production by Ovum Pick-up in Water Buffalo. *Theriogenology* 50, 259
- Galli, C., Crotti, G., Notari C., Turini, P., Duchi, R., Lazzari, G. (2000) Embryo production by ovum pick-up from live donors. *Theriogenology* 55,1341-1357
- Gandolfi, F., T. A. Brevini, L. Richardson, C. R. Brown, and R. M. Moor. (1989) Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function in embryonic development. *Development* 106:303-312.

- Gandolfi F., Brevini T.A.I., Modena S., Passoni L. (1992). Early embryonic signal: embryo maternal interaction before implantation. *Animal. Reprod. Sci.*, 28:269-276.
- Gasparini B. (2002) In vitro embryo production in buffalo species: state of the art. *Proc. Annual Conference International Embryo Transfer Society*, Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. *Theriogenology*; 57: 237-256.
- Gasparini B. (2006) Advances on in vitro embryo production in water buffalo. *Proc of the 5th Asian Buffalo Congress on "Social economic contribution of buffalo to rural areas"*, April 18-22, Nanning, China Vol 1, 15-21
- Gasparini B., Neglia G., Di Palo R., Campanile G., Zicarelli L. (2000). Effect of cysteamine during in vitro maturation on buffalo embryo development. *Theriogenology* 54, 1537-1542.
- Gasparini B., Neglia G., Caracciolo di Brienza V., Campanile G., Di Palo R., Zicarelli L. (2001). Preliminary analysis of vitrified in vitro produced embryos. *Theriogenology* 55, 307
- Gasparini B., Sayoud H., Neglia G., De Matos D., Donnay I., Zicarelli L. (2003) Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. *Theriogenology* 60, 943-952
- Gasparini B., Boccia L., De Rosa A., Di Palo R., Campanile G., Zicarelli L. (2004a) Chemical activation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes by different methods: effects of aging on post-parthenogenetic development. *Theriogenology* 62/9, 1627-1637
- Gasparini B., Boccia L., De Rosa A., Vecchio D., Di Palo R., Zicarelli L. (2004b) In vitro fertilization of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of media and sperm motility inducing agents. *Reprod Fertil Dev* 16, 255.
- Gasparini B., Boccia L., De Rosa A., Vecchio D., Di Palo R., Zicarelli L., (2004). In vitro fertilization of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of media and sperm motility inducing agents. *Reprod Fertil Dev* 16, 255.
- Gasparini B., Boccia L., Marchandise J., Di Palo R., George F., Donnay I., Zicarelli L. (2006) Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology*; 65(2): 275-87.

- Gasparri B., Attanasio L., De Rosa A., Monaco E., Di Palo R., Campanile G. (2007a) Cryopreservation of in vitro matured buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes by minimum volumes vitrification methods. *Anim Reprod Sci* 98 (3-4), 335-42
- Gasparri B., De Rosa A., Attanasio L., Boccia L., Di Palo R., Campanile G., Zicarelli L. (2007b) Influence of the duration of in vitro maturation and gamete co-incubation on the efficiency of in vitro embryo development in Italian Mediterranean Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim Reprod Sci*; 105 (3-4): 354-364.
- B. Gasparri, A. De Rosa, L. Attanasio, L. Boccia, R. Di Palo, G. Campanile, L. Zicarelli. Influence of the duration of in vitro maturation and gamete co-incubation on the efficiency of in vitro embryo development in Italian Mediterranean Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim Reprod Sci* 2008; 105 (3-4): 354-364
- Gerena, R. L. and G. J. Killian. (1990). Electrophoretic Characterization of Proteins in Oviduct Fluid of Cows During the Estrous-Cycle. *Journal of Experimental Zoology* 256:113-120.
- Go KJ, Wolf DP. (1985) Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol reprod*; 32: 145-153.
- Gonçalves RF, Wolinetz CD, Killian GJ. Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (αV and $\alpha 5$) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. *Theriogenology*. 2007 Feb;67(3):468-74. Epub 2006 Oct 9
- Goswami S.L., Manik R.S., Balakrishnan C.R. (1992). Status of buffalo and goat ovaries collected from slaughterhouse. In: *Proceedings of the Symposium on embryo transfer technology held at IVRI Izatnagar, April 16–17*.
- Grazyna Ptak, Loi P., Dattena M., Tischner M., Cappai P. (1999). Offspring from One-Month-Old Lambs: Studies on the Developmental Capability of Prepubertal Oocytes. *Biology Of Reproduction*;61, 1568–1574.
- Guerette P, Langlais J, Antaki P, Chapdelaine A, Roberts K (1988) Activation of phospholipase A2 of human spermatozoa by proteases. *Gamete Res* 19:203–214.

- Gwatkin R.B.L., Anedersen O.F. (1969) Capacitation of hamster spermatozoa by bovine follicular fluid. *Nature*;224:1111-1112.
- Gwayi N & Bernard RTF (2002) The effects of melatonin on sperm motility in vitro in Wistar rats. *Andrologia* 34 391–396
- Handrow RR, First NL, Parrish JJ. (1989) Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *J Exp Zool*; 252:174-182.
- Hao, Y., N. Mathialagan, E. Walters, J. Mao, L. Lai, D. Becker, W. Li, J. Critser, and R. S. Prather. (2006). Osteopontin reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Biol Reprod* 75:726-733.
- Harper MIK. (1973) Stimulation of sperm movement from the isthmus to the site of fertilization in the rabbit oviduct. *Biol Reprod*;8:369- 377.
- Hasler, J. F., W. B. Henderson, P. J. Hurtgen, Z. Q. Jin, A. D. Mccauley, S. A. Mower, B. Neely, L. S. Shuey, J. E. Stokes, and S. A. Trimmer. (1995) Production, Freezing and Transfer of Bovine IVF Embryos and Subsequent Calving Results. *Theriogenology* 43:141-152.
- Hasler, J.F.; Bilby, C.R.; Collier, R.J.; Denham, S.C.; Lucy, M.C. . (2003) Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program ; 59(9):1919-28.
- Henault, M. A., G. J. Killian, J. F. Kavanaugh, and L. C. Griel, Jr. (1995). Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. *Biol Reprod* 52:390-397.
- Homa ST and Swann K (1994) A cytosolic sperm factor triggers calcium oscillations and membrane hyperpolarizations in human oocytes *Human Reproduction* 9 2356–2361.
- Hong CY, Chiang BN, Huang JJ, Wu P. (1985) Two plasminogen activators, streptokinase and urokinase, stimulate human sperm motility. *Andrologia*;17:317–20.
- Huang Y, Zhuang X, Gasparrini B, Presicce GA (2005) Oocyte recovery by ovum pick-up and embryo production in Murrah and Nili-Ravi buffaloes (*Bubalus bubalis*) imported in China. *Reprod Fertil Dev* 17 (1,2), 273

- Huarte J, Belin D, Bosco D, Sappino A-P, Vassalli J-D (1987) Plasminogen activator and mouse spermatozoa: urokinase synthesis in the male genital tract and binding of the enzyme to the sperm cell surface. *J Cell Biol* 104:1281–1289.
- Huarte J, Vassalli J-D, Belin D, Sakkas D (1993) Involvement of the plasminogen activator / plasmin proteolytic cascade in fertilization. *Dev Biol* 157:539–546.
- Hufana-Duran D, Pedro PB, Venturina HV, Hufana RD, Salazar AL, Duran PG, Cruz LC (2004) Post-warming hatching and birth of live calves following transfer of in vitro-derived water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Theriogenology* 61, 1429-1439
- Hunter AG, Moor RM, (1987): Stage dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. *J Dairy Sci* 70, 1646–1651.
- Hunter RHF, Hall JP. (1973) Capacitation of boar spermatozoa: the influence of post-coital separation of the uterus and fallopian tubes. *Anat Rec* 180:597-604.
- Hunter RHF, Nichol R. (1988) Capacitation potential of the fallopian tube: a study involving surgical insemination and the subsequent incidence of polyspermy. *Gamete Res* ;21:255-266.
- Hunter R.H.F, Greve T (1997) Could artificial insemination of cattle be more fruitful? Penalties associated with aging eggs. *Reprod Domest Anim* 32, 137-42
- Hunter R.H.F. (1988). Transport of gametes. In: *The Fallopian tubes: Their role in fertility and infertility*. Springer-Verlag, New York: pp 53-74.
- Hunter R.H.F., Nichol R. (1983). Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: Preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. *J Exp Zool*, 228:121-128.
- Hunter, R.H.F., Wilmut I. (1983). The Rate of Functional Sperm Transport Into the Oviducts of Mated Cows. *Animal Reproduction Science* 5:167-173.
- Hynes, R. O. (1992) Integrins - Versatility, Modulation, and Signaling in Cell-Adhesion. *Cell* 69:11-25.

- Iwasaki A & Gagnon C (1992) Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertility and Sterility* 57 409–416.
- Ishizuka, B., Kuribayashi, Y., Murai, K., Amemiya, A., Itoh, M.H. (2000) The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice. *J. Pineal Res.* 28: 48-51.
- Jaconi ME, Theler JM, Schlegel W, Appel RD, Wright SD, Lew PD. (1991) Multiple elevations of cytosolic-free Ca^{2+} in human neutrophils: initiation by adherence receptors of the integrin family. *J Cell Biol*;112:1249–57.
- Jainudeen M.R., Takahashi Y., Nihayah M., Kanagawa H. (1993) In vitro maturation and fertilization of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*31: 205-212.
- Janssen-Caspers H.A.B., Wladimiroff J.W., van Gent I., Alberda A.Th., Leerentveld R.A., Zeilmaker G.H. and Drogendijk A.C. (1988) Ultrasonically guided percutaneous and transvaginal foficle aspiration; a comparative study, *Human Reproduction*, Vol. 3, No. 3, pp. 337-339
- Johnson, G. A., R. C. Burghardt, T. E. Spencer, G. R. Newton, T. L. Ott, and F. W. Bazer. (1999) Ovine osteopontin: II. Osteopontin and $\alpha(v)\beta(3)$ integrin expression in the uterus and conceptus during the periimplantation period *Biol Reprod* 61:892-899.
- Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW, Spencer TE. (2003) Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biol Reprod*; 69: 1458–71.
- Kapur, R. P. and L. V. Johnson (1985) An oviductal fluid glycoprotein associated with ovulated mouse ova and early embryos. *Dev. Biol* 112:89-93.
- Kaul, G., Sharma, G. S., Singh, B. & Gandhi, K. K. (2001) Capacitation and acrosome reaction in buffalo bull spermatozoa assessed by chlortetracycline and *Pisum sativum* agglutinin fluorescence assay. *Theriogenology* 55, 1457–1468.
- Kawakami, E., Vandevoort, C., Mahi-Brown, C., Tollner, T. & Overstreet, J. W. (1993) Comparison of a fluoresceinated lectin stain with triple staining for evaluating acrosoma reactions of dog sperm. *Journal of Experimental Zoology* 265, 599–603.

- Kaya A., Aksory M., Baspinar N., Yildiz and Ataman MB. (2001) Effect of melatonin implantation to sperm donor rams on post-thaw viability and acrosomal integrity of sperm cells in the breeding and non-breeding season. *Reprod dom animal* 36, 211-215.
- Keskinetepe, L., C. L. Burnley, and B. G. Brackett. (1995) . Production of Viable Bovine Blastocysts in Defined In-Vitro Conditions. *Biology of Reproduction* 52:1410-1417.
- Kennaway DJ, Gilmore TA. (1985) Effects of melatonin implants in rams lambs. *J Reprod Fertil*;73:85–91.
- King R.S, Anderson S.H., Killian G.J. (1994) Effect of Bovine Oviductal Estrus-Associated Protein on the Ability of Sperm to Capacitate and Fertilize Oocytes. *J. Androl.*; 15:468-478.
- Killian, G. J., D. A. Chapman, and L. A. Rogowski. (1993) Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod* 49:1202-1207.
- Kitiyant Y., Chaisalee B., Pavasuthipaisit K. (2002) Evaluation of the acrosome reaction and viability in buffalo spermatozoa using two staining methods: the effects of heparin and calcium ionophore A23187, *international journal of andrology*, 25:215–222.
- Klentzeris, L. D., S. Fishel, H. McDermott, K. Dowell, J. Hall, and S. Green. (1995) A positive correlation between expression of beta 1-integrin cell adhesion molecules and fertilizing ability of human spermatozoa in vitro. *Hum. Reprod* 10:728-733.
- Kobayashi T., Matsuda Y., Park J., Hara I., Kaneko S., Fujimoto Y., Nozawa S., Akihama S. (1992) Trypsin-like arginine amidases including plasminogen and plasmin in human seminal plasma by affinity adsorption and elution. *Arch Androl* 28:165–170.
- Kochhar H.S., Kochhar K.P., Basrur P.K., King W.A. (2003) Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of in vitro produced bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 77, 33-49
- Koivisto M.B., Costa M.T.A., Perri S.H.V., Vicente W.R.R (2009) The effect of season on semen characteristics and freezability in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls in the Southeastern region of Brazil. *Reprod Dom Anim* 44, 587-592

- Kovacs A., Foote R.H. (1992): Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotechnic and Histochemistry*; 67:119-124.
- Lacroix M, Smith FE, Fritz IB. (1977) Secretion of plasminogen activator by Sertoli cell enriched cultures. *Mol Cell Endocrinol*;9:227-36.
- Lamirande E & O'Flaherty C (2008) Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1784 106–115.
- Le Van Ty, Chupin D, Draincourt DA. (1989) Ovarian follicular populations in buffaloes and cows. *Anim. Reprod. Sci.*; 19: 171-178.
- Lee, M. A., Trucco, G. S., Bechtol, K. B., Wummer, N., Kopf, G.S., Blasco, L. & Storey, B. T. (1987) Capacitation and acrosoma reactions in human spermatozoa monitored by chlortetracycline fluorescence assay. *Fertility and Sterility* 48, 649–658.
- Legge M, Sellens MH (1991) Free radical scavengers ameliorate the 2 cell block in mouse embryo culture. *Hum Reprod* 6, 867–871.
- Leonardsson G, Peng XR, Liu K, Nordstrom L, Carmeliet P, Mulligan R, et al (1995). Ovulation efficiency is reduced in mice that lack plasminogen activator gene function: functional redundancy among physiological plasminogen activators. *Proc Natl Acad Sci USA*;92: 12446–50.
- Leveille MC, Roberts KD, Chevalier S, Chapdelaine A, Bleau G. (1987). Uptake of an oviduct antigen by the hamster zona pellucida. *Biol Reprod*;36:227-238.
- Lessey, B. A., L. Damjanovich, C. Coutifaris, A. Castelbaum, S. M. Albelda, and C. A. Buck. (1992). Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J. Clin. Invest* 90:188-195.
- Li L XuJN, Wong YHY, Pang SF. (1998) Molecular and cellular analysis of melatonin receptor-mediated CAMP signalling in rat corpus epididimis.
- Lippes J, Krasner J, Alfonso LA, Dacalos ED, Lucero R. (1981) Human oviductal fluid proteins. *Fertil Steril* ;36:623-629.
- Lippes J, Wagh PV. (1989) Human oviductal fluid (hOF) proteins. IV. Evidence for hOF proteins binding to human sperm. *Fertil Steril* 1989;5(l): 89-94.

- Liu K, Liu YX, Qun D, Zhou HM, Lin X, Hu ZY (1996) Preliminary studies on the role of plasminogen activator in seminal plasma of human and rhesus monkey. *Mol Hum Reprod*;2:99–104.
- Liu Y, Du Q, Zhou H, Liu K, Hu Z. (1996) Regulation of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 in cultured rat Sertoli and Leyding cells. *Sci China C Life Sci*;39:37-44.
- Liu YX, Liu K, Zhou HM, Du Q, Hu ZY, Zou RJ. (1995) Hormonal regulation of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 in cultured monkey Sertoli cells. *Hum Reprod*;10: 719-27.
- Liu YX, Ny T, Sarkar D, Loskutoff D, Hsueh AJ. (1986) Identification and regulation of tissue plasminogen activator activity in rat cumulus-oocyte complexes. *Endocrinology*; 119:1578–87.
- Liu YX. (2007) Involvement of plasminogen activator and Plasminogen activator inhibitor type 1 in spermatogenesis, sperm capacitation and fertilization. *Semin Thromb Hemost*;33:29–40.
- Llanos M, Lui CW, Meizel S (1982) Studies of phospholipase A2 related to the hamster sperm acrosome reaction. *J Exp Zool* 221:107–117.
- Long, J. A., Wildt, D. E., Wolfe, B. A., Critser, J. K., DeRossi, R.V. & Howard, J. (1996) Sperm capacitation and acrosoma reaction are compromised in teratospermic domestic cats. *Biology of Reproduction* 54, 638–646.
- Lu K. H., Gordon I., Gallagher M., Mc Govern H.(1987) Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *Vet. Rec.*;121: 259-260.
- Lui CN, Cornett LE, Meizel S. (1977). Identification of the bovine follicular protein involved in the in vitro induction of the hamster sperm acrosome reaction. *Biol Reprod.*; 17:34-41.
- Lukoseviciute K., Zilinskas H., Januskauskas A. (2004) Effect of Exogenous Progesterone on Post-thaw Capacitation and acrosome reaction of bovine spermatozoa. *Reprod Dom Anim*;39,154-161.
- Madan M.L., Chauhan M.S., Singla S.K., Manik R.S. (1994a) Pregnancies established from Water buffalo (*Bubalus bubalis*) blastocysts derivad from in vitro matured, in vitro fertilized oocytes and co-cultured with cumulus and oviductal cells. *Theriogenology*; 42: 591-600

- Madan M.L., Singla S.K., Chauhan M.S., Manik R.S. (1994b) In vitro production and transfer of embryos in buffaloes. *Theriogenology*; 41: 139-143.
- Madan ML, das SK, Palta P. (1996) Application of reproductive technologies to buffaloes. *Anim Reprod Sci*;42:299-306;
- Malayer JR, Hansen PJ, Buhi WC. (1988) Secretion of proteins by cultured bovine oviducts collected from estrus through early diestrus. *J Exp Zoo*; 248:345-353.
- Manjunatha BM, Devaraj M, Gupta PS, Ravindra JP, Nandi S. (2008) Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo in vitro embryo development. *Reprod Domest Anim.*;44(1):12-6.
- Marquant-Le Guienne B., Humblot P., Thibier M., Thibault C., (1990) Evaluation of bull semen fertility by homologous in vitro fertilization tests. *Reprod Nutr Dev.*; 30:259-66
- Marston J.H., Chang M.C. (1964) The fertilizable life of ova and their morphology following delayed insemination in mature and immature mice. *J Exp Zool* 15, 237-51
- Mastroianni, L., Jr., M. Urzua, and R. Stambaugh. (1970) Protein patterns in monkey oviductal fluid before and after ovulation. *Fertil. Steril.* 21:817-820.
- McNutt T, Rogowski L, Vasilatos-Younken R, Killian G. (1992) Adsorption of oviductal fluid proteins by the bovine sperm membrane during in vitro capacitation. *Mol Reprod Dev*, 33:313-323.
- McNutt T.L., Killian G.J. (1991) Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation in vitro. *J Androl*; 12: 244-252.
- Mehmood A., Anwar M., Saqlan Naqvi SM.. (2007). Capacitation of Frozen Thawed Buffalo Bull (*Bubalus bubalis*) Spermatozoa with Higher Heparin Concentrations; *Reprod Dom Anim* 42, 376–379;
- Meizel S. (1985) Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface. *Am J Anat* 174:285–302.
- Meizel S., Lui C.W. (1976) Evidence for the role of a trypsin-like enzyme in the hamster sperm acrosome reaction. *J Exp Zool* 195:137–144.

- Meizel S., Turner K.O. (1986). Glicosaminoglycans stimulate the acrosoma reaction of previously capacitated hamster sperm. *J Exp Zool.* 237:137-139.
- Melendrez, C. S., Meizel, S. & Berger, T. (1994) Comparison of the ability of progesterone and heat solubilized porcine zona pellucida to initiate the porcine sperm acrosome reaction in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 39, 433–438.
- Meur S.K., Roy S.B., Mohan G., Dhoble R.I. (1988) Cryogenic changes in seminal proteins of cattle and buffalo. *Theriogenology* 30,1005-1010
- Mishra V., Misra A.K., Sharma R. (2007a) A comparative study of parthenogenetic activation and in vitro fertilization of bubaline oocytes. *Anim Reprod Sci* doi:10.1016/j.An ReproSci.2006.12.019
- Mishra V., Misra A.K., Sharma R. (2007b) Effect of ambient temperature on in vitro fertilization of Bubaline oocyte, *Anim Reprod Sci* doi:10.1016/j.An ReproSci.2006.10.020
- Misra A.K. (1997) Application of biotechnologies to buffalo breeding in India. Third course on Biotechnology of Reproduction in buffaloes. Caserta-Italy-October 6-10, supplement to N° 4 of *Bubalus bubalis*;141-166;
- Misra A.K. (2005) Embryo transfer technology in buffaloes. Process and developments. In: National Seminar on Recent Advances in Conservation of Biodiversity and Augmentation of Reproduction and Production in Farm Animals, Sardarkrushinagar, India, March 6–7
- Moller C.C., Wassarman P.M. (1989) Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev Biol* 132:103– 112.
- Monaco E., De Rosa A., Attanasio L., Boccia L., Zicarelli L., Gasparrini B. (2006) In vitro culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos in the presence or absence of glucose. *Reproduction in Domestic Animals* 41 (4), 332
- Monaco E., Gasparrini B., Boccia L., De Rosa A., Attanasio L., Zicarelli L., Killian G. (2009) Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle. *Theriogenology*;

- Moura, A.A., D.A. Chapman, and G.J. Killian. (2006). Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from holstein bulls of documented fertility. *Mol. Reprod Dev.* 74:214-222.
- Naitana S, Loi P, Ledda S, Cappai P, Dattena M, Bogliolo L. and Leoni G. (1996) Effect of biopsy and vitrification of ovine embryos at different stages of development. *Theriogenology*; 46: 813-824;
- Nandi S, Raghu HM, Ravindranatha BM, Chauhan MS. (2002) Production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos in vitro: Premises and Promises. *Reprod Dom Anim*; 37, 65-74.
- Nandi S., Chauhan M.S., Palta P. (1998) Effect of cumulus cells and sperm concentration on cleavage rate and subsequent embryonic development of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*;50: 1251-1262.
- Nandi S., Chauhan M.S., Palta P. (2001). Effect of environmental temperature on quality and developmental competence in-vitro of buffalo oocytes. *Vet. Rec.* 148, 278–279
- Neglia G., Gasparrini B., Caracciolo di Brienza V., Di Palo R. and Zicarelli L. (2003b). First pregnancies to term after transfer of buffalo vitrified embryos entirely produced in vitro. *Proceedings LVII Convegno S.I.S.VET., Ischia, Napoli, Italia*: 445–446.
- Neglia G., Gasparrini B., Caracciolo di Brienza V., Di Palo R., Campanile G., Presicce G.A., Zicarelli L. (2003). Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology* 59 (5-6):1123-30.
- Neglia G., Gasparrini B., Caracciolo di Brienza V., Di Palo R., Zicarelli L. (2004) First pregnancies to term after transfer of buffalo vitrified embryos entirely produced in vitro. *Veterinary Research Communication (Special Issue)* 28, 233–236
- Neglia G., Marino M., Di Palo R., Wilding M., Caracciolo di Brienza V., Dale B., Gasparrini B., Zicarelli L. (2001) A comparison of in vitro maturation in buffalo (*Bubalus bubalis*) and bovine oocytes using confocal microscopy. *27th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society*

(IETS), Omaha, Nebraska, USA, Jan 13–16, 2001. *Theriogenology*; 55: 488.

Niwa K, Park C-K and Okuda (1991) Penetration in vitro of bovine oocytes during maturation by frozen—thawed spermatozoa *Journal of Reproduction and Fertility* 91 329-336

Ny T., Bjersing L., Hsueh A.J., Loskutoff D.J. (1985) Cultured granulosa cells produce two plasminogen activators and an antiactivator, each regulated differently by gonadotropins. *Endocrinology*;116:1666–8.

O'Connell M.L., Canipari R., Strickland S. (1987) Hormonal regulation of tissue plasminogen activator secretion and mRNA levels in rat granulosa cells. *J Biol Chem*; 262:2339–44.).

O'Flaherty C, de Lamirande E & Gagnon C (2006) Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radical Biology & Medicine* 41 528–540.

Oehninger, S., Blackmore, P., Morshedi, M., Sueldo, C., Acosta, A. A. & Alexander, N. J. (1994) Defective calcium influx and acrosome reaction (spontaneous and progesterone-induced) in spermatozoa of infertile men with severe teratozoospermia. *Fertility and Sterility* 61, 349–354.

Oldberg, A., A. Franzen, and D. Heinegard. (1986) Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83:8819-8823

Oliphant G, Reynolds AB, Smith PF, Ross PR, Marta JS. (1984) Immunocytochemical localization and determination of hormone-induced synthesis of the sulfated oviductal glycoproteins. *Biol Reprod*;3 1: 165-167.

Ooba T., Sricharoen P., Areekijseree M., Kitiyanant Y., Pavasuthipaisit K. (1990) Evaluation of acrosome reaction in bovine sperm by a triple-staining technique. *Journal of Physiology Science* 3, 91–104.

Otoi T., Tachikawa s., Kondo S., Suzuki T. (1993) Effects of different lots of semen from the same bull on in vitro development of bovine oocytes fertilized in vitro. *Theriogenology* 39:713-8

- Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Handrow R.R., Sims M.M., First N.L. (1989). Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biology of Reproduction*, 40:1020-1025.
- Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod*; 38:1171–80.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J., Winer, M. A. & First, N. L. (1988) Capacitation of Bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction* 38, 1171–1180.
- Pawshe C.H., Appa Rao K.B.C., Totey S.M. (1998) Effect of insulin-like growth factor I and its interaction with gonadotrophins on in vitro maturation and embryonic development, cell proliferation, and biosynthetic activity of cumulus-oocytes complexes and granulosa cells in buffalo. *Mol Reprod Dev* 49, 277-285
- Pawshe C.H., Totey S.M. (1993) Effects of cumulus cells monolayer on in vitro maturation of denuded oocytes of buffalo (*Bubalus Bubalis*). *Theriogenology* 39,281.
- Pe´rez, L. J., de Valca´rel, A., las´ Heras, M. A., Moses, D. & Baldassarre, H. (1996) Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology* 46, 131–140.
- Pereira, R. J., Tuh, R. K., Wallenhorst, S. & Holtz, W. (2000) The effect of heparin caffeine and calcium ionophore A23187 on in vitro induction of the acrosome reaction in frozen–thawed bovine and caprine spermatozoa. *Theriogenology* 54, 185–192.
- Pero M.E., Killian G.J., Lombardi P., Zicarelli L., Avallone L., Gasparrini B. (2007) Identification of osteopontin in water buffalo semen. *Proc of the 33th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society*, Kyoto, Japan, 6-10 January 2007. *Reproduction, Fertility and Development*;
- Pollard J.W., Plante C., King W.A., Hansen P.J., Betteridge K.J., Suarez. S.S. (1991). Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding of oviductal epithelial cells. *Biol Reprod* 44:102-107.
- Poleszczuk O, Papis K, Wenta-Muchalska E (2004) An effect of melatonin on development of bovine embryos cultured in vitro under optimal or enhanced oxygen tensions. *Reprod Fertil Dev* 17, 224.

- Prather R.S. and Day B.N. (1998) Practical considerations for the in vitro production of pig embryos. *Theriogenology* 49(1), 23-32
- Rajamahendran, R., Ambrose, J. D. & Lee, C. Y. (1994) Antihuman sperm monoclonal antibody HS-11: a potential marker to detect bovine sperm acrosome reaction in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 101, 539-545.
- Reiter R.J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* 12:151, 1991.
- Reese J.H., McNeal J.E., Redwine E.A., Stamey T.A., Freiha F.S. (1988) Tissue type plasminogen activator as a marker for functional zones, within the human prostate gland. *Prostate*;12:47-53.
- Rekkas, C.A., Tsakmakidis, I., Koronaki, A., Mastranestasis, I., Samartzi, F., Vainas, E. (2003). Addition of Melatonin to media improves in vitro maturation rate of swine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals* 38:327.
- Robitaille G, St-Jacques S, Potier M, Bleau G. (1988) Characterization of an oviductal glycoprotein associated with the ovulated hamster oocyte. *Bio Reprod*; 38:687-694.
- Rodriguez C.M., Day J.R., Killian G.J. (2000) Osteopontin Gene Expression in the Holstein Bull Reproductive Tract *Journal of Andrology*, Vol. 21, No. 3
- Rubessa M., Di Fenza M., Mariotti E., Di Francesco S., de Dilectis C., Di Palo R., Zicarelli L., Gasparrini B. (2009) Kinetics of sperm penetration is correlated to in vitro fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. *Reproduction fertility and development*, vol. 21 (I); p. 206, ISSN: 1031-3613.
- Roy S. C. and Atreja S. K. (2006) Tyrosine phosphorylation of a 38-kDa capacitation-associated buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm protein is induced by L-arginine and regulated through a cAMP/PKA-independent pathway. *International Journal of Andrology* Volume 31 Issue 1, p12 - 24
- Sá Filho M.F., Carvalho N.A.T., Gimenes L.U., Torres-Junior J.R., Ferriera C.R., Perecin F., Perini A.P., Tetzner T.A.D., Vantini R., Soria G.F., Garcia J.M., Tonhati H., Zicarelli L., Gasparrini B., Baruselli P.S. (2005) Birth of the first buffalo calves after transfer of vitrified embryos produced in vitro in America. *Atti del 3° Congresso Nazionale sull'Allevamento del*

Bufalo- 1° Buffalo Symposium of Europe and the Americas; October 12-15, Capaccio-Paestum (SA), Italy, 250

- Sa S.J., Rhee H.H, Cheong H.T, Yang B.K, Park C.K. (2006) Effects of plasmin on sperm-oocyte interactions during in vitro fertilization in the pig.
- Saling P.M. (1981) Involvement of a trypsin-like activity in binding of mouse spermatozoa to zonae pellucidae. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:6231–6235.
- Samad H.A., Nasser A.A. (1979). A quantitative study of primordial follicles in buffalo heifer ovaries. *Compendium 13 FAO/SIDA Int. Course Anim. Reprod.*
- Schroeder A.C., Schultz R.M., Kopf G.S., Taylor F.R., Becker R.B., Eppig J.J. (1990) Fetuin inhibits zona pellucida hardening and conversion of ZP2 to ZP2f during spontaneous mouse oocyte maturation in vitro in the absence of serum. *Biol Reprod* 43:891–897.
- Schwartz MA. (1993) Spreading of human endothelial cells on fibronectin or vitronectin triggers elevation of intracellular free calcium. *J Cell Biol*;120:1003–10.
- Shinohara H., Yanagimachi R., Srivastava P.N. (1985) Enhancement of the acrosome reaction of hamster spermatozoa by the proteolytic enzymes, kallikrein, trypsin and chymo-trypsin. *Gamete Res* 174:285–302.
- Shiu S, Yu Z, Chow P, Pang S. (1996) Putative melatonin receptors in the male reproductive tissues. In: Tang P, Pang S, Reiter R, editors. *Melatonin: a universal photoperiodic signal with diverse actions*. HongKong: Karger;. p. 90–100.
- Sidhu K.S., Dhindsa J. S. and Guraya S. S. (1992) A Simple Staining Procedure for Detecting the true Acrosome Reaction in Buffalo (*Bubalus bubalis*) Spermatozoa. *Biotechnology Histochemistry*, 67(1): 35-39
- Sirard M.A., Florman H., Leibfried-Rutledge M.L., First N.L. (1989) Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 40, 1527-63
- Sirotkin A, Schaeffer HJ. (1997) Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin. *J Endocrinol*;154:1–5.

- Skriver L., Nielsen L.S., Stephens R., Dano K. (1982) Plasminogen activator released as inactive proenzyme from murine cells transformed by sarcoma virus. *Eur J Biochem* 124:409–414.
- Smith, T.T. and Yanagimachi R. (1989). Capacitation status of hamster spermatozoa in the oviduct at various times after mating. *J. Reprod Fertil.* 86:255-261.
- Smokovitis A., Kokolis N., Alexopoulos C., Alexaki E., Eleftheriou E. (1987) Plasminogen activator activity, plasminogen activator inhibition and plasmin inhibition in spermatozoa and seminal plasma of man and various animal species. Effect of plasmin on sperm motility. *Fibrinolysis*;1:253–7.
- Smokovitis A., Kokolis N., Taitzoglou I., Rekkas C. (1992) Plasminogen activator: the identification of an additional proteinase at the outer acrosomal membrane of human and boar spermatozoa. *Int J Fertil*; 37:308–14.
- Souza CE, Moura AA, Monaco E, Killian GJ. (2008) Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Anim Reprod Sci*;105:72–89.
- Stephoe, P. C. and R. G. Edwards. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2:366
- Stice S.L. and Robl J.M. (1990) Activation of mammalian oocytes by effector obtained from rabbit sperm. *Mol. Reprod. Dev.*; 25, 272-280.
- Stone, S. L. and Hamner. C. D. (1975). Biochemistry and physiology of oviductal secretions. *Gynecol. Invest* 6:234-252.
- Sumantri C., Boediono A., Ooe M., Murakami M., Saha S., Suzuki T. (1997) The effect of sperm-oocyte incubation time on in vitro embryo development using sperm from a tetraparental chimeric bull. *Anim Reprod Sci* 48, 187-95
- Sutton, R., C. D. Nancarrow, A. L. Wallace, and N. W. Rigby. (1984). Identification of an oestrus-associated glycoprotein in oviducal fluid of the sheep. *J. Reprod Fertil.* 72:415-422.

- Swann K. (1990) A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster oocytes Development 110 1295–1302.
- Swann K. (1994) Ca^{++} oscillations and sensitization of Ca^{++} release in unfertilized mouse eggs injected lead a sperm factor. Cell Calcium;15, 331-339.
- Taitzoglou I., Kokolis N., Smokovitis A. (1996) Release of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor from spermatozoa of man, bull, ram and boar during acrosome reaction. Mol Androl 8:187–197.
- Taitzoglou I.A., Chapman D.A., Killian G.J. (2003) Induction of the acrosome reaction in bull spermatozoa with plasmin. Andrologia; 35:112–6.
- Taitzoglou I., Ioannis A., David A. Chapman, Ioannis A. Zervos, Killian G.J. (2004) Effect of plasmin on movement characteristics of ejaculated bull spermatozoa.
- Takahashi M, Nagai T, Hamano S, Kuwayama M, Okamura N, Okano A. (1993) Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. Biol Reprod; 49:228–32.
- Talbot P., Chacon R. (1981a) Detection of modifications in the tail of capacitated guinea pig sperm using lectins. J Exp Zool 216:435–444.
- Talbot, P. & Chacon, R. S. (1981b) A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. Journal of Experimental Zoology 215, 201–208.
- Talbot P., Shur B.D., Myles D.G. (2003) Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. Biology of Reproduction, v. 68, p. 1-9.
- Tanphaichitr, N. & Hansen, D. (1994) Production of motile acrosome reacted mouse sperm with nanomolar concentration of calcium ionophore A23187. Molecular of Reproduction and Development 37, 326–334.
- Tervit H.R., Whittingham D.G., Rowson L.E. (1972) Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. J. Reprod. Fertil.;30 (3): 493-497.

- Tesarik J., Mendoza Oltras C., Tesart J. (1990) Effect of the human cumulus oophorus on movement characteristics of human capacitated spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1990; 88: 665-675.
- Thibier M. (2005) The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reprod. Nutr. Dev.*; 45: 235–242;
- Tolli R., Monaco L., Di Bonito P., Canipari R. (1995) Hormonal regulation of urokinase- and tissue- type plasminogen activator in rat Sertoli cells. *Biol Reprod*; 53:193-200.
- Totey S.M., Pawshe C.H., Appa Rao K.B.C. (1996). In vitro maturation of buffalo oocytes: role of insulin and its interaction with gonadotrophins. *J. Reprod. Fert. Supplement* 50: 113-119.
- Totey S.M., Pawshe C.H., Singh G.P. (1993a) Effects of bull and heparin, and sperm concentrations on in vitro fertilization of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured in vitro. *Theriogenology*; 39: 887-898.
- Totey S.M., Pawshe C.H., Singh G.P. (1993b) In vitro maturation and fertilization of buffalo oocytes (*Bubalus Bubalis*): Effects of media, hormones and sera. *Theriogenology* 39, 1153-1171.
- Totey S.M., Singh G., Teneja M., Pawshe C.H., Talwar G.P. (1992) In vitro maturation, fertilization and development of follicular oocytes from buffalo (*Bubalus bubalis*). *J. Reprod. Fertil.*;95: 597-607.
- Tsantarliotou M.P. (2007) Melatonin administration increased plasminogen activator activity in ram spermatozoa. *Theriogenology* 69, 458-465.
- Urzua, M. A., R. Stambaugh, G. Flickinger, and L. Mastroianni, Jr. (1970). Uterine and oviduct fluid protein patterns in the rabbit before and after ovulation. *Fertil. Steril.* 21:860-865.
- Van Vuuren RJ, Pitou MP. (1992) Purative melatonin receptor in human spermatozoa.
- Valasi, F., Tsiligianni, Th., Papanikolaou, Th., Dimitriadis, I., Vainas, E., Samartzi, F., Amiridis, G.S., (2006). Melatonin improves the developmental competence of sheep oocytes. *Reproduction in Domestic Animals* 41:341.

- Verhage HG, Fazleabas AT, Donnelly K. (1988) The in vitro synthesis and release of proteins by the human oviduct. *Endocrinology*; 122:1639-1645
- Verhage H G; Fazleabas A T; Mavrogianis P A; O'Day-Bowman M B; Donnelly K M; Arias E B; Jaffe R C (1997) - The baboon oviduct: characteristics of an oestradiol-dependent oviduct-specific glycoprotein. *Human reproduction update*;3(6):541-52.
- Voglmayr JK, Sawyer RF. (1986) Surface transformation of ram spermatozoa in uterine, oviduct and cauda epididymal fluids in vitro, *Journal of Reproduction and Fertility* 78 315-325.
- Wang RX, Brooks DE. (1986) Protein composition of the luminal fluid and protein synthesis in vitro by the oviducts and uteri of ovariectomized, pro-oestrus and 5-day pregnant rats. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 64, 257–269
- Wang WH, Uchida M and Niwa K (1992) Effects of follicle cells on in vitro penetration of pig oocytes by cryopreserved, ejaculated spermatozoa *Journal of Reproduction and Development* 38 125—131
- Ward, C. R. & Storey, B. T. (1984) Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Developmental of Biology* 104, 287– 296.
- Ward F.A., Rizos D., Corridan D., Quinn K., Boland M.P., Lonergan P., (2001) Paternal influence on the time of the first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. *Mol Reprod Dev*; 60:47-55
- Ward F., Enright B., Rizos D., Boland M., Lonergan P. (2002) Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology* 57, 2105-2117.
- Wegner CC, Kiilian GJ. (1992) Origin of oestrus-associated glycoprotein in bovine oviductal fluid *J. Reprod. Fert.* 95:841-454.
- Whitaker and Swann, (1993) The soluble sperm oscillogen hypothesis.
- Wilding M., Gasparrini B., Neglia G., Dale B., Zicarelli L. (2003). Mitochondrial activity and fertilization potential of fresh and cryopreserved buffalo

sperm. Proceedings Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Auckland, New Zealand, Theriogenology; 59: 466.

Wolf, D. P., Boldt, J., Byrd, W. & Bechtol, K. B. (1985) Acrosomal status evaluation in human ejaculated sperm with monoclonal antibodies. *Biology of Reproduction* 32, 1157–1162.

Wrana, J. L., Q. Zhang, and J. Sodek. (1989) Full Length Cdna Sequence of Porcine Secreted Phosphoprotein-I (Spp-I, Osteopontin). *Nucleic Acids Research* 17:10119.

Wu H, He CL and Fissore RA (1997) Injection of a porcine sperm factor triggers calcium oscillations in mouse oocytes and bovine oocytes *Molecular Reproduction and Development* 46: 176–189.

Xu K.P., Greve T. (1988). A detailed analysis of early events during in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *J Reprod Fertil*; 82:121-134.

Yadav B.R., Katiyar P.K., Chauhan M.S., Madan M.L. (1997) Chromosome configuration during in vitro maturation of goat, sheep and buffalo oocytes. *Theriogenology* 47, 943-51

Yanagimachi R. (1969) In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J Reprod Fertil*; 18:275-286.

Yanagimachi R., Suzuki F. (1985) A further study of lysolecithinmediated acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *Gamete Res* 11:29–40.

Zhang, J., Boyle, M. S., Smith, C. A. & Moore, H. D. M. (1990) Acrosome reaction of stallion spermatozoa evaluated with monoclonal antibody and zona free hamster eggs. *Molecular of Reproduction and Development* 27, 152–158.

Zhang L., Jiang S., Wozniak P.J., Yang X., Godke R.A. (1995) Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization and embryo development in vitro. *Mol Reprod Dev* 40, 338-344.

Zhang T., Zhou H.M., Liu Y.X. (1997) Expression of plasminogen activator and inhibitor, urokinase receptor and inhibin subunits in rhesus monkey testes. *Mol Hum Reprod*;3:223-31.

- Zicarelli L. (1997) Superovulatory response in buffaloes bred in Italy. Third Course on Biotechnology of Reproduction in buffaloes, Caserta, Italy, 167-188;
- Zicarelli L. (2001) Biotechnologie riproduttive nell'allevamento bufalino. Atti 1° Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo, Eboli (SA), Italy, 3-5 ottobre; 163-179;
- Zicarelli L. (2002) Advanced reproductive technologies for improving buffalo production. Proceedings of the 1st Buffalo Symposium of Americas; September 1-8, Belém, Pará, Brazil: 186-205.
- Zicarelli L., Mariotti E., Di Francesco S., Velotto S., Rubessa M., Neglia G. (2009). Effect of bull on in vitro sperm capacitation induced by different agents in buffalo species (*Bubalus bubalis*)
- Zimolo Z, Wesolowski G, Tanaka H, Hyman JL, Hoyer JR, Rodan GA. (1994) Soluble alpha v beta 3-integrin ligands raise $[Ca^{2+}]$ in rat osteoclasts and mouse-derived osteoclast-like cells. *Am J Physiol*;266:C376–81.